

**Anreicherung und Charakterisierung
der Enzyme des Hamamlosemetabolismus**

Jürgen Wiczorek

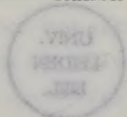
1976

Anreicherung und Charakterisierung
der Enzyme des Hamamelosemetabolismus.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des

Fachbereichs Biologie
der

Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt
von

Jürgen Wieczorek
aus
München

Juni 1976



1. Berichterstatter: Prof.Dr.A.Schmidt
2. Berichterstatter: Prof.Dr.O.Kandler

Tag der mündlichen Prüfung: 27.7.1976

Inhaltsverzeichnis

Seite:

1.	<u>Einleitung und Aufgabenstellung</u>	1
2.	<u>Material und Methoden</u>	6
2.1.	Chemikalien	6
2.2.	Darstellung kristalliner, nicht radioaktiv markierter Hamamelose	6
2.3.	Darstellung von $G^{14}C$ -markierter Hamamelose..	6
2.3.1.	Pflanzenmaterial	6
2.3.2.	Präparation der $G^{14}C$ -markierten Hamamelose..	7
2.4.	Darstellung von radioaktiv markiertem und nicht markiertem Ham 2^1P	7
2.5.	Papierchromatographische und elektrophoreti- sche Trennverfahren	8
2.6.	Lokalisation von Substanzen auf Chromato- grammen und Pherogrammen	9
2.7.	Messung der Radioaktivität	9
2.8.	Präparation der Proteinrohextrakte	10
2.8.1.	Anzucht der Bakterien	10
2.8.2.	Präparation der Rohextrakte	12
2.9.	Konzentrierung der Eluate der Säulenchroma- tographie	12
2.10.	Dialyse	13
2.11.	Molekulargewichtsbestimmung	13
3.	<u>Ergebnisse</u>	14
3.1.	Wachstum von <i>K. citrophila</i> unter verschiede- nen Bedingungen	14
3.2.	Hamamelosekinase	17
3.2.1.	Bestimmung der Enzymaktivität	17
3.2.1.1.	Bestimmung des verbrauchten ATP	18
3.2.1.2.	Bestimmung des gebildeten Ham 2^1P	19

3.2.1.3.	Genauigkeit der Bestimmungsmethoden	20
3.2.2.	Stabilität der Hamamelose-Kinase	22
3.2.3.	Anreicherung der Hamamelosekinase	25
3.2.3.1.	Reinigungsschritte	25
3.2.3.2.	Ermittlung der Kinaseaktivitätsverteilung im Eluat nach Säulenchromatographie	28
3.2.4.	Charakterisierung der Hamamelosekinase	29
3.2.4.1.	Molekulargewicht	29
3.2.4.2.	Substratspezifität	29
3.2.4.3.	pH-Optimum	30
3.2.4.4.	Kinetische Daten	32
3.2.4.5.	Mg ²⁺ als Effektor der Kinasereaktion	32
3.3.	Fructose 1-phosphat-Synthase	36
3.3.1.	Nachweis der enzymatischen Aktivität	36
3.3.1.1.	Bestimmung der Fru 1-P-Synthaseaktivität mit der ¹⁴ C-Methode	36
3.3.1.2.	Bestimmung der Fru 1-P-Synthaseaktivität im optischen Test	37
3.3.2.	Nachweis der Synthaseaktivität im Rohextrakt	38
3.3.3.	Anreicherung der Fru 1-P-Synthase	43
3.3.4.	Einstellung eines Reaktionsgleichgewichtes..	47
3.4.	Fructose 1-phosphat-Kinase	48
3.4.1.	Nachweis der Enzymaktivität	49
3.4.2.	Anreicherung der Fru 1-P-Kinase	50
3.4.3.	Molekulargewicht	53
3.4.4.	Charakterisierung der Fru 1-P-Kinase	53
3.4.4.1.	steady state Kinetik	53
3.4.4.2.	Das pre steady state Verhalten der gereinig- ten Fru 1-P-Kinase von K. citrophila	58
4.	<u>Diskussion</u>	62
4.1.	Hamamelosekinase	62
4.2.	Fru 1-P-Synthase	68

4.3.	Fru 1-P-Kinase	69
4.4.	Regulation des Abbaus	72
5.	<u>Zusammenfassung</u>	76
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	80

Abkürzungen:

Ham	Hamamelose
HDP	Hamamelosebisphosphat
Fru	Fructose
FDP	Fructosebisphosphat
Glc	Glucose
-P	Phosphat
GA	Glycerinaldehyd
GAP	Glycerinaldehydphosphat
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
ATP	Adenosin 5'triphosphat
ADP	Adenosin 5'diphosphat
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduzierte Form
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreit
TAA	Triäthanolaminhydrochlorid
TCA	Trichloressigsäure
BSA	Rinderserumalbumin
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
PGK	Phosphoglyceratkinase
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GDH	α -Glycerophosphatdehydrogenase
TIM	Triosephosphatisomerase
LDH	Lactatdehydrogenase
PK	Pyruvatkinase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGS	Phosphoglycerat
o.D.	optische Dichte
M	molar
mM	millimolar
MG	Molekulargewicht
Fru-Pe	Fru 1P + FDP

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Neben Monosacchariden mit unverzweigtem Kohlenstoffskelett treten in der Natur auch solche mit verzweigtem Kohlenstoffgerüst auf. Die meisten bis jetzt bekannten verzweigten Monosaccharide sind Bestandteile von Antibiotika und werden von Mikroorganismen gebildet (z.B. Streptose, Mycarose und Cladinose). Dagegen sind aus grünen Pflanzen bisher nur zwei bekannt geworden: Apiose und Hamamelose (1,14). Von diesen sind die Biosynthesemechanismen recht gut erforscht worden (2-10). Die Biosynthese der Apiose ist auch hinsichtlich ihrer Enzymatik schon weitgehend geklärt (11-13); dagegen liegen in dieser Richtung über die Hamamelose noch keine Untersuchungen vor. Der Abbaumechanismus der Hamamelose ist im Gegensatz zur Apiose schon bearbeitet.

Die derzeitigen Vorstellungen (6, 10) vom Anabolismus und Katabolismus der Hamamelose sind in Abb. 1 dargestellt:

In den Chloroplasten der grünen Pflanzen wird FDP in einem Reaktionsschritt intramolekular zu Hamamelose 2¹,5-bisphosphat umgelagert, das wohl zum Teil durch die Plastidenmembran ins Cytoplasma diffundiert und dort durch unspezifische Phosphatase-Reaktionen stufenweise zu Hamamelose dephosphoryliert wird (6). Nach den Untersuchungen von Thanbichler kann in *Primula clusiana* Tausch die in beträchtlichen Mengen synthetisierte Hamamelose nur bis zur Stufe ihres Zuckeralkohols, des Hamamelits, weiter metabolisiert werden (9). Ein weiterer Metabolismus war, von einer sehr langsam verlaufenden Reaktion des Hamamelits mit Galaktose zu Clusianose (1-O- α -D-Galactopyranosyl-Hamamelit) abgesehen (20), dann nicht mehr nachweisbar. Da die Primeln selbst also offensichtlich freie

ANABOLISMUS

FDP $\longrightarrow$ HDP $\longrightarrow$ Ham-P $\longrightarrow$

Hamamelose

KATABOLISMUS

Primula $\longrightarrow$ Hamamelit $\longrightarrow$ Clusianose

Pseudomonas H₁ $\longrightarrow$ Hamamelonsäure

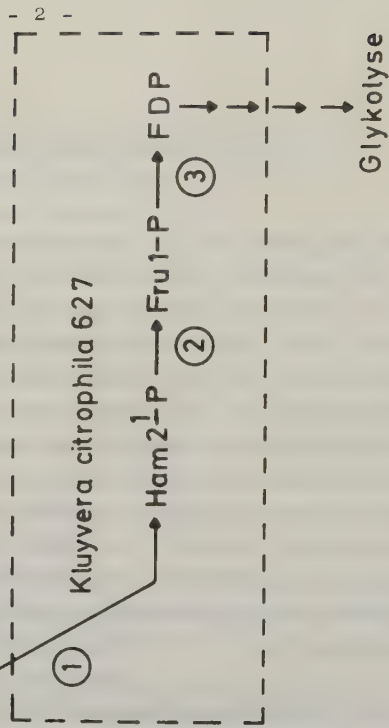


Abb. 1: Metabolismus der Hamamelose. Nach (6, 9)

Hamamelose nicht abbauen können, versuchte Thanbichler Mikroorganismen zu finden, die diesen verzweigt-kettigen Zucker als Kohlenstoffquelle nutzen können. Ein aus der Erde des Wurzelbereichs von *Primula clusiana* Tausch isolierter *Pseudomonas*-Stamm (H1) vermag zwar Hamamelose zu Hamamelonsäure zu oxidieren, jedoch bleibt dabei das Kohlenstoffgerüst unverändert (9). Aus vergilbenden Blättern von *Primula clusiana* Tausch wurde dann schließlich ein Bakterienstamm isoliert, der Hamamelose zu CO_2 abbauen kann; er wurde als *Kluyvera citrophila* identifiziert und erhielt die Stammbezeichnung 627. Mit Hilfe von Isotopenstudien konnte Thanbichler den in Abb. 1 angegebenen Abbaupfad für die Puffervergärung wahrscheinlich machen.

Für den Ablauf der Reaktionssequenz $\text{Ham} \rightarrow \text{Ham}2^1\text{-P} \rightarrow \text{Fru } 1\text{-P} \rightarrow \text{FDP}$ werden demnach drei spezielle Enzyme benötigt (Abb. 1: ①, ②, ③):

1) Hamamelosekinase (ATP: Hamamelose 2¹-Phosphotransferase)

Hexokinase aus Hefe (Hersteller: Boehringer Mannheim) kann Hamamelose in vitro nicht phosphorylieren (55). Für die in vivo-Reaktion muß daher das Vorhandensein einer spezifischen Hamamelosekinase, bzw. einer isozymen Form der Hexokinase gefordert werden, die Hamamelose als Substrat verwerten kann.

2) Fructose 1-phosphat Synthase (Hamamelose 2¹-phosphat Aldehydlyase)

Wie für die Synthese (6) ist als Schlüsselreaktion auch des Katabolismus von Hamamelose eine intramolekulare Umlagerung postuliert worden, die in einem Reaktionsschritt verlaufen soll (9). Das Hamamelose-Molekül müßte nach Dehydrierung von C_4 zwischen den Kohlenstoffatomen 2 und 3 gespalten werden (Abb. 2). Da eine Kondensation von C_4 mit C_2^1 wegen des Phosphatesters blockiert ist, wird das C_2^1 der Hamamelose zum C_1 der Fructose und das C_1 zum C_3 . C_2 bleibt C_2 .

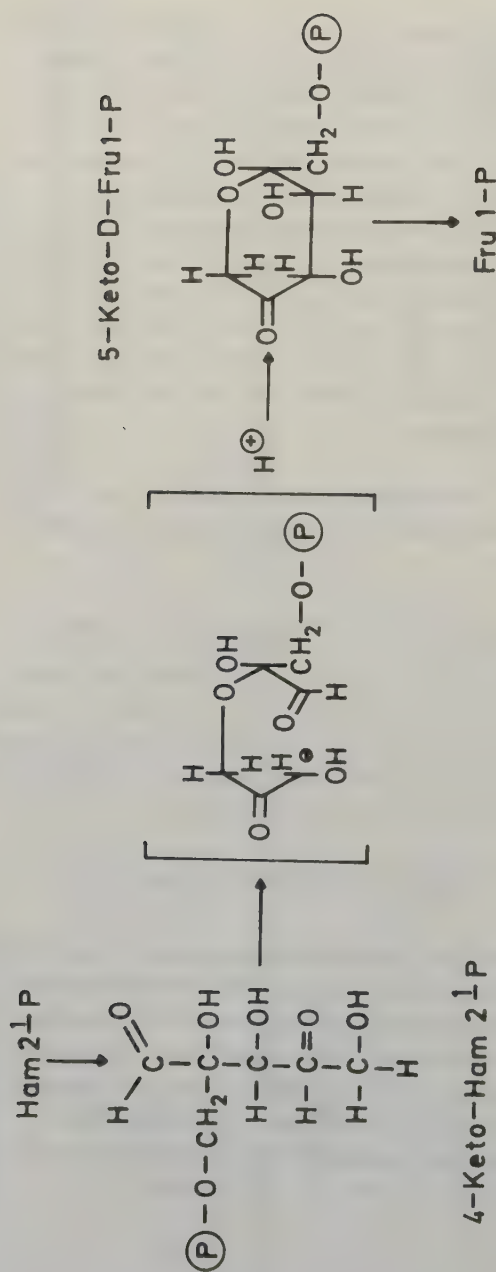


Abb. 2: Hypothetisches Schema der Umlagerung von Ham 2^1P zu Fru 1-P
 (Umkehrung des Reaktionsverlaufes des Biosyntheseweges nach
 Beck et al. (58).)

C₃, C₄, C₅ ergeben die C-Atome 4,5 und 6 der Fructose. Das postulierte Enzym, die Fru 1-P Synthase führt die Reaktion offensichtlich in einem Schritt ohne Freisetzung von Triose oder Triose-P aus.

3) Fructose 1-phosphat-Kinase (ATP: Fructose 1-phosphat 6 Phosphotransferase E.C.2.7.1.56.)

Eine spezifische Fructose 1-phosphat-Kinase, wie sie schließlich zur Synthese von FDP aus Fru 1-P benötigt wird, ist bereits von Reeves et al. (15) aus *Bacteroides symbiosis* und von Hanson und Anderson (16, 17) aus *Aerobacter aerogenes* isoliert worden. Zwar kann nicht a priori ausgeschlossen werden, daß Fru 1-P nicht über FDP sondern über eine unspezifische Aldolase-Reaktion der FDP-Aldolase (E.C.4.2.1.13.) (48) metabolisiert wird. Da *Kluyvera citrophila* jedoch auf Hamamelose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann, ist dieser Weg nicht wahrscheinlich: Die sehr geringen Geschwindigkeiten der unspezifischen Aldolasereaktionen lassen den zum Wachstum erforderlichen effektiven Metabolismus auf diesem Wege nicht erwarten. So bleibt als wahrscheinlichste Reaktion die Phosphorylierung von Fru 1-P zu FDP durch das Enzym Fru 1-P-Kinase.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die drei postulierten Enzyme (Hamamelose Kinase, Fru 1-P Synthase, Fru 1-P Kinase) in *Kluyvera citrophila* 627 nachzuweisen und anzureichern. Mit diesen Enzymen sollte dann die von Thanbichler geforderte Sequenz Ham $\rightarrow$ Ham 2¹-P $\rightarrow$ Fru 1-P $\rightarrow$ FDP in vitro durchgeführt werden, um die aus Isotopenstudien abgeleiteten Vorstellungen vom Hamamelosekatabolismus von der enzymatischen Seite her zu unterstützen. Nach der Anreicherung sollten die drei Enzyme dann charakterisiert werden und schließlich sollten dann aus diesen Daten soweit als möglich Vorstellungen über die Regulation der katabolischen Sequenz entwickelt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Alle Enzyme, die als Hilfsenzyme für die Bestimmung der Aktivität der untersuchten Enzyme verwendet wurden, stammten von der Firma Boehringer, Mannheim. Radiochemikalien wurden vom Radiochemical Centre, Amersham, England, gekauft. Zur säulenchromatographischen Auftrennung wurden Materialien der Firmen Serva (DEAE-Cellulose), Pharmacia (Sephadex G-100, Sephadex G-200) und BioRad (Hydroxylapatit, Calciumphosphat-Gel) verwendet. Hamamelisrinde lieferte die Firma Bender und Hobein, München.

2.2. Darstellung kristalliner, nicht radioaktiv markierter Hamamelose

Die für die Anzucht der Bakterien und für die Charakterisierung der Enzyme benötigte kristalline, nicht radioaktiv markierte Hamamelose wurde nach der Methode von Gilck et al. (18) dargestellt. Aus mechanisch zerkleinerter Hamamelisrinde wird dabei Hamamelitannin extrahiert und anschließend mit HCl hydrolysiert. Die dabei entstehende Hamamelose wird über eine Celite-Säule und anschließend mit Aktivkohle gereinigt und aus Methanol/Petroläther kristallisiert.

2.3. Darstellung von G-¹⁴C-markierter Hamamelose (19,20)

2.3.1. Pflanzenmaterial

G-¹⁴C-markierte Hamamelose wurde aus Blättern von *Primula clusiana* Tausch nach Assimilation von ¹⁴CO₂ isoliert. Die hierfür benötigten Primelpflanzen stammten aus dem Botanischen Garten München oder aus dem Alpenpflanzengarten am Schachen (Wettersteingebirge). Verwendet wurden junge, frisch entrollte

Blätter solcher Pflanzen, die gerade Fruchtansatz zeigten, da sie den besten Einbau von ^{14}C in Hamamelose erwarten lassen (56).

2.3.2. Präparation der G- ^{14}C -markierten Hamamelose

Junge Blätter wurden für 30 Minuten in der von van Scherpenberg (21) beschriebenen Apparatur in $^{14}\text{CO}_2$ haltiger Luft belichtet. Nach erschöpfender Extraktion mit kochendem 70 %igem Alkohol wurde die ebenfalls extrahierte Polygalacturonsäure durch Zugabe von Aceton im Verhältnis 1 : 1 (v : v) ausgefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde lyophilisiert, der Rückstand in Ammoniumformiatpuffer aufgenommen und auf Whatman-Papier Nr. 3 durch Hochspannungselektrophorese aufgetrennt. Hamamelose und Hamamelit bleiben dabei neben den übrigen ungeladenen Substanzen am Start sitzen. Nach Elution dieser Bande konnten dann Fructose und Hamamelose plus Hamamelit durch zweimalige eindimensionale Chromatographie im Fließmittelgemisch II getrennt werden. Die beiden letztgenannten Verbindungen müssen aufgrund ihres ähnlichen Laufverhaltens mittels Boratelektrophorese getrennt werden. Die Isolierung der G- ^{14}C -markierten Hamamelose aus dem Boratkomplex erfolgte nach Thanbichler (9).

2.4. Darstellung von radioaktiv markiertem und nicht markiertem Ham 2^1-P

Das für den Nachweis und die Charakterisierung von Fru 1-P-Synthase und Fru 1-P-Kinase benötigte Ham 2^1-P konnte direkt mit Hilfe der aus *Kluyvera citrophila* isolierten Hamamelosekinase hergestellt werden.

Der Reaktionsansatz enthielt in TAA-Puffer (0,1 M; pH 7,5; 0,1 mM DTE) Hamamelose (4,24 mM), ATP (5,31 mM) und MgCl_2 (5,31 mM). Gestartet wurde die Reaktion mit Hamamelosekinase. Nach 30-minütiger Inkubationsdauer bei 30°C wurde die Reaktion

durch 5-minütiges Erhitzen auf 100°C abgestoppt. Nicht umgesetzte Hamamelose wurde von Ham 2¹-P durch Hochspannungselektrophorese im Ammoniumformiatpuffer (siehe 2.5.) abgetrennt. Durch Zugabe von radioaktiv markierter Hamamelose zum Reaktionsansatz, die mengenmäßig als nicht ins Gewicht fallend betrachtet wurde, konnte Ham 2¹-P definierter spezifischer Aktivität erhalten werden.

2.5. Papierchromatographische und elektrophoretische Trennverfahren

Die papierchromatographischen Trennungen wurden auf Whatmanpapier Nr. 1, bei größeren Substanzmengen auf Whatmanpapier Nr. 3, absteigend bei 25°C durchgeführt. Dafür wurden folgende Fließmittelgemische verwendet:

- (I) 88 % (w/w) Phenol : H₂O : Eisessig : 1 m Na₂EDTA
440 : 160 : 10 : 1 (v:v)
- (II) n-Butanol : Pyridin : H₂O : Eisessig
60 : 40 : 30 : 3 (v:v)

Zur Identifizierung oder Reinigung von Substanzen wurde Papierelektrophorese (22) in folgenden Puffersystemen durchgeführt:

- (1) 0,1 m Ammoniumformiat pH 3,7 (58)
27 V/cm; 8°C; 90 min
- (2) 0,1 m Natriumtetraborat pH 9,8 (23)
5,5 V/cm; 8°C; 90 min

Zur Elektrophorese wurde Whatmanpapier Nr. 3 verwendet. Um bei der Ermittlung der Enzymaktivität der Hamamelosekinase eine größere Anzahl von Proben gleichzeitig auftrennen zu können, erwies es sich als günstig, 3,5 cm breite Laufflächen für die einzelnen Proben durch Herausschneiden 2 mm breiter Papierstreifen zu trennen, um damit ein Ineinanderlaufen der

Substanzen zu verhindern. Die Proben wurden jeweils strichförmig am Start aufgetragen.

2.6. Lokalisation von Substanzen auf Chromatogrammen und Pherogrammen

Von den Papierchromatogrammen und -pherogrammen wurden, wenn nicht anders vermerkt ist, mit Currix RP-Film Radioautogramme hergestellt. Zur Lokalisation von Hamamelosephosphat nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die 3,5 cm breiten Pherogrammstreifen mit einem Papierstreifenzähler (Frieeseke und Hoepfner FHT 101 C und FHT 780 A) ausgewertet.

Bei Chromatogrammen und Pherogrammen, wo es nicht auf eine extreme Trennschärfe vieler Flecken ankam - im besonderen Fall ist dabei an die chromatographische Trennung von Fru und Ham nach erfolgter Fru 1-P-Synthasereaktion gedacht -, erfolgte die Lokalisation mit einer Beta-Camera (Berthold-Frieeseke BF 290). Die Radioaktivität auf dem Chromatogramm erzeugt dabei in einer gasdurchspülten Zählkammer Szintillationsblitze, die mit einer Polaroidcamera aufgenommen werden. Vom fertigen Photo können die Flecken mit einem Epidiaskop auf das Chromatogramm bzw. Pherogramm übertragen werden.

Nicht radioaktiv markierte Zucker und Substanzen mit vicinalen Hydroxylgruppen wurden durch Sprühen mit alkalischem Silbernitrat (24) bzw. mit Benzidin und Perjodat (25) angefärbt.

2.7. Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivitätsbestimmung von gelösten, ^{14}C -markierten Substanzen erfolgte im Szintillationszähler in einem Dioxan-Cocktail folgender Zusammensetzung: 1 l Dioxan, 7 g Butyl-PBD, 100 g Naphthalin.

Die Radioaktivitätsverteilung auf Papierchromatogrammen und -pherogrammen wurde nach dem Anzeichnen der Flecken mit einem

Methandurchflußzählrohr mit großflächigem Endfenster bestimmt. Bei der Lokalisation der Radioaktivität auf Pherogrammstreifen im Streifenzähler wurde die Strahlung durch einen Integrator gleichzeitig quantitativ erfaßt.

War die Radioaktivität für eine hinreichend genaue Messung im Proportionalzählrohr zu gering, so wurden die Flecken ausgeschnitten und ihre Radioaktivität im Szintillationszähler unter Verwendung eines Toluolcocktails (5 g Butyl-PBD, 1 l Toluol) gemessen.

2.8. Präparation der Proteinrohextrakte

2.8.1. Anzucht der Bakterien

Den Bakterienstamm *Kluyvera citrophila* 627 stellte freundlicherweise das Milchwirtschaftliche Institut, Weihenstephan, aus seiner Sammlung zur Verfügung*. Auf Schrägagar bei 4°C gehalten, sind diese Mikroorganismen 6-8 Monate lebensfähig. Nach einigen Passagen durch Flüssigmedium können sie dann wieder 6-8 Monate auf Schrägagar gehalten werden.

Zur Anzucht größerer Mengen von *Kluyvera citrophila* 627 wurden flüssige Nährmedien folgender Zusammensetzung verwendet (Pro 1 l destilliertes Wasser):

Nährmedium I (9)	2 g KH_2PO_4
	2 g K_2HPO_4
	1 g NaCl
	1 g NH_4Cl
	20 mg $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ **
	20 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ **
	1,4 mg FeCl_3
	1 ml Hoaglands AZ-Lösung

Als einzige Kohlenstoffquelle wurde Hamamelose (3 g/l) zugesetzt.

* Herrn Dr. A.Kleeberger danke ich für die Überlassung der Bakterien.

** Diese Salzlösungen wurden zur Vermeidung einer Niederschlagsbildung jeweils getrennt autoklaviert und erst nach Abkühlung der Lösung der übrigen Salze zugesetzt.

Nährmedium II:	Nährmedium I
	10 g Pepton (Merck)
	1 g Hamamelose

Hamamelose wurde wegen ihrer Labilität bei Zimmertemperatur sterilisiert. Dies erfolgte durch Abfiltrieren einer Hamameloselösung durch ein bakteriendichtes Filter.

Beide Nährmedien hatten einen pH-Wert von 6,4.

Ausgehend von den Arbeiten Thanbichlers, der den Bakterien im Hinblick auf die Puffervergärung als einzige organische Verbindung Hamamelose angeboten hatte, wurden die Bakterien zunächst in Nährmedium I mit Hamamelose als einziger Kohlenstoffquelle angezogen. Der relativ hohe Hamameloseverbrauch (0,3 % pro Ansatz), der obendrein nur zu einer geringen Bakterienmasse führte, erforderte die Suche nach einem effizienteren Nährmedium. Zusatz von 1 % Pepton ermöglichte eine Reduktion der Hamamelosekonzentration von 0,3 % auf 0,1 % wobei im Falle der Hamamelosekinase eine 5-fach höhere Enzymausbeute im Verhältnis zur eingesetzten Hamamelosemenge erzielt wurde. Abb. 3 zeigt die Wachstumskurven von *K.citrophila* in den verschiedenen hamamelose- und glucosehaltigen Medien. Die Kombination Hamamelose und Pepton zeigt am Ende der logarithmischen Phase die höchste optische Dichte.

Vom Schrägagar wurden die Bakterien auf ein Röhrchen mit 5 ml Nährmedium II überimpft. Um die lange lag-Phase der Kultur (Abb.3c) abzukürzen, war es notwendig, 2-3 Passagen je 12 Stunden bei 30°C auf dem Schüttelbrett durchzuführen. Danach wurde der gesamte Inhalt des Röhrchens auf sechs 1 l Erlenmeyerkolben, die je 250 ml des Nährmediums II enthielten, aufgeteilt und wieder auf dem Schüttelbrett bei 30°C inkubiert. Für die Isolierung von Ham-Kinase und Fru 1-P-Kinase erfolgte die Ernte der Bakterien am Ende der log-Phase (Abb. 13: E₁), während für die Isolierung der Fru 1-P-Synthase 24 Stunden

bebrütet werden mußte. Die Bakterien konnten in diesem Falle daher erst aus der stationären Phase geerntet werden (Abb.13:E₂).

2.8.2. Präparation der Rohextrakte

Bei der Präparation der Rohextrakte wie auch bei allen Anreicherungs-schritten wurde bei 4°C gearbeitet.

Die Präparation des Rohextraktes verlief für alle drei Enzyme nach dem gleichen Schema: 1,5 l der Zellkultur wurden 20 Minuten lang bei 6000 g abzentrifugiert, der Niederschlag zweimal mit Phosphatpuffer (0,1 M KH₂PO₄; pH 6,4; 4°C) gewaschen und schließlich in 30 ml dieses Puffers aufgenommen. Im Gegensatz zur Methode Thanbichlers, die Bakterienzellen mit Ultraschall aufzuschließen, erwies sich der Aufschluß der Bakterien mit der French-Press als wirkungsvoller und schonender, insbesondere für die Hamamelosekinase (26). Vor dem Aufschluß wurde die Suspension mit DTE bis zu einer Endkonzentration von 0,1mM versetzt. Nach dem Aufschluß wurde der unlösliche Rückstand 20 Minuten bei 20 000 g abzentrifugiert und einmal mit 20 ml Phosphatpuffer ausgewaschen. Die vereinigten Überstände, die den Rohextrakt bildeten, wurden in Portionen je 5 ml bei -20°C aufbewahrt.

2.9. Konzentrierung der Eluate der Säulenchromatographie

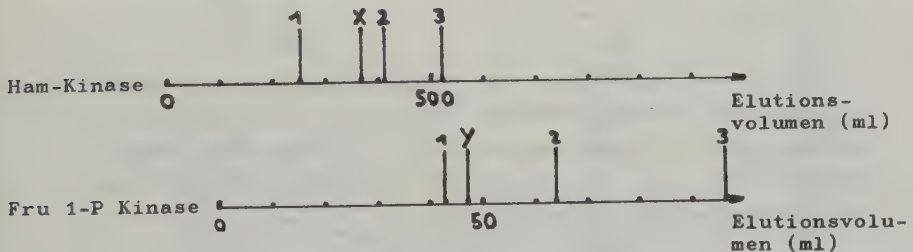
Eluate, die bei der säulenchromatographischen Auftrennung von Proteinfraktionen erhalten wurden, konnten wegen geringer Proteinkonzentration (<1 mg/ml) nicht mehr durch Fällung mit Ammoniumsulfatlösung konzentriert werden. Sie wurden daher in einer Ultrafiltrationszelle (Diaflo, Amicon) mit 1,5 atm N₂-Überdruck unter Verwendung einer PM 10 Membran auf das gewünschte Volumen eingengt. Alle Moleküle, deren Molekulargewicht größer als 10⁴ ist, werden dabei zurückgehalten.

2.10. Dialyse

Erforderliche Dialysen wurden in Dialyseschläuchen (1,5 cm Ø; bei größeren Mengen 3 cm Ø) der Union Carbide durchgeführt, die nach Quellung im Wasser ohne weitere Vorbehandlung verwendet wurden. Dialysiert wurde unter ständigem Rühren gegen 2 l 4°C kaltes, entionisiertes Wasser, das im Falle der Ham-Kinase Anreicherung mit 0,1 mM DTE versetzt war. Kürzere Dialysezeiten ließen sich durch mehrmaliges Wechseln des Wassers erzielen.

2.11. Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichte von Ham-Kinase und Fru 1-P-Kinase wurden nach der Methode von Andrews (27) nach Chromatographie an Sephadex G-200 bzw. G-100 abgeschätzt. Als Eichproteine wurden dabei Cytochrom C (MG: 12500), Albumin aus Hühnerei (MG: 45000) und Aldolase (Kaninchen, MG: 158000) verwendet. Aus einem Diagramm, in dem log MG gegen Elutionsvolumen angetragen wird, wurde das gesuchte Molekulargewicht ermittelt.



(1: Aldolase; Y: Fru 1-P Kinase; 2: Albumin;
3: Cytochrom C; X: Hamamelosekinase)

(Die Lage der gesuchten Enzyme im Elutionsdiagramm wurde nicht, wie bei Andrews (27) über die Aktivitätsbestimmung ermittelt, da im Falle der Ham-Kinase die Aktivität während der Chromatographie verloren ging, bzw. bei der Fru 1-P-Kinase die Aktivität der einzelnen Fraktionen für einen optischen Test zu gering war. Im Elutionsdiagramm traten bei der Bestimmung des MG sowohl von Ham-Kinase als auch von Fru 1-P-Kinase neben den Eichproteinen nur noch ein weiterer Peak auf. Diejenige Fraktion der einzelnen Peaks mit der jeweils größten o.D. bei 280 nm wurde für die Bestimmung des Elutionsvolumens verwendet.)

3. Ergebnisse

3.1. Wachstum von K. citrophila unter verschiedenen Bedingungen

Wenn K. citrophila nur Hamamelose als einzige Kohlenstoffquelle angeboten wurde, resultierte eine geringe Bakterienmasse. Um die Ausbeuten an Enzym steigern zu können, wurde ein Nährmedium gesucht, das, ohne einen Aktivitätsverlust der Hamamelose-metabolisierenden Enzyme zu verursachen, höhere Ausbeute an Bakterienmasse gewährleisten sollte. Abbildung 3 zeigt die Wachstumskurven von K. citrophila unter verschiedenen Bedingungen: Die Bakterien können auf Ham, Glc und Pepton allein wachsen. Bei einem Wachstum auf Pepton als einziger Kohlenstoffquelle resultiert am Ende der logarithmischen Phase eine höhere o.D. als mit Ham oder Glc als alleiniger Kohlenstoffquelle. Die Kombination Pepton + Zucker bewirkt eine nochmalige Erhöhung der o.D., wobei ein Maximum bei der Kombination Pepton + Ham vorliegt (Abb. 3 a, b).

Um die langen lag-Phasen, die beim Überimpfen vom Schrägagar auf das Medium auftraten (Abb. 3 c, d) abzukürzen, wurden vorher einige Passagen durch Flüssigmedium durchgeführt. Abb. 3 a und 3 b zeigen die dadurch auftretenden Verkürzungen der lag-Phase.

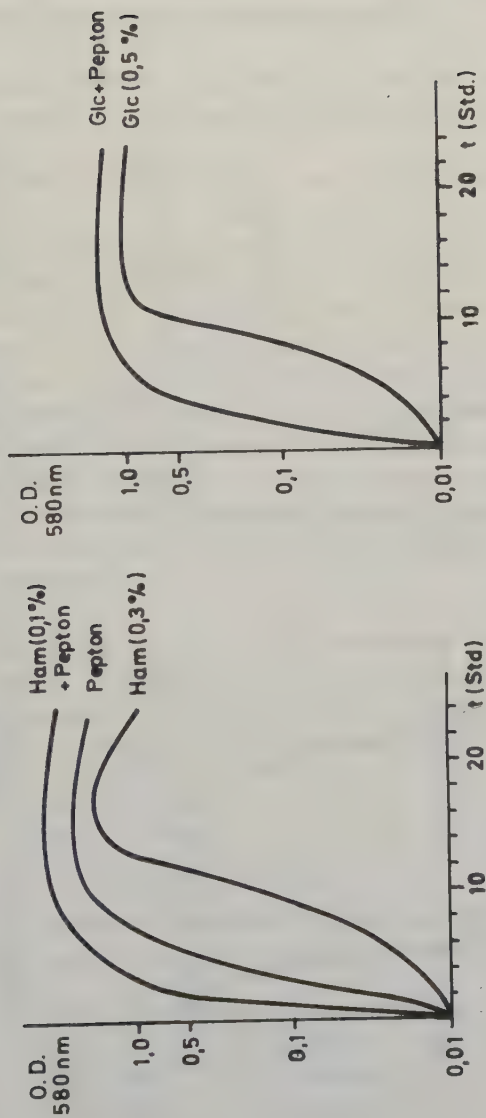


Abb. 3 a, b: Wachstumskurven von *K. citrophila* in verschiedenen Nährmedien.
a, b: mit vorausgehenden Passagen durch Flüssigmedium.

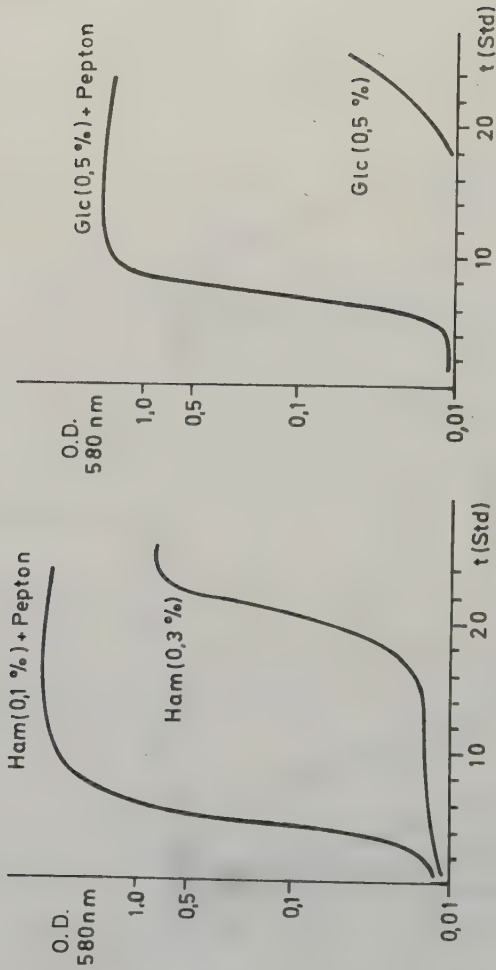
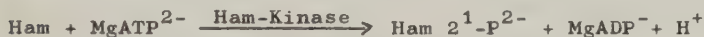


Abb. 3 c, d: Wachstumskurven von *K. citrophila* bei den selben Bedingungen wie in Abb. 3 a, b, aber ohne vorausgehende Passagen durch Flüssigmedium.

3.2. Hamamelosekinase (ATP: Hamamelose 2¹-Phosphotransferase)

3.2.1. Bestimmung der Enzymaktivität (28)

Die Hamamelosekinase katalysiert die erste Reaktion der in Abb. 1 angegebenen Sequenz des Hamameloseabbaus:



Da das Reaktionsprodukt Ham 2¹-P mit keinem bisher beschriebenen Enzym - die isolierte Fru 1-P Synthase (3.3.) ausgenommen - umsetzbar ist (55), konnte für die Ermittlung der Ham-Kinaseaktivität kein optischer Test ausgearbeitet werden, der eine kontinuierliche spektrophotometrische Verfolgung der Reaktion ermöglicht hätte. Für eine kontinuierliche Messung der Rate durch Registrierung der pH-Änderung (29), oder durch photometrische Messung der ADP-Produktion über LDH, PK und PEP (30) waren die vorhandenen Enzymaktivitäten zu gering. Deshalb wurde die Enzymaktivität der Ham-Kinase im "stop-time assay" bestimmt:

In Eppendorf-Mikroreaktionsgefäßen wurden die Reaktanden in TAA-Puffer (0,1 M; pH 7,5; 0,1 mM DTE) für 30 min bei 30°C gehalten. Maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde bei folgenden Konzentrationen der Reaktionspartner erhalten:

Ham	4,24 mM
ATP	5,31 mM
Mg	5,31 mM

$[\text{MgATP}]^{2-}$ verhält sich dabei zu $[\text{Ham}]$ wie 1,25 : 1.
Gewöhnlich wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

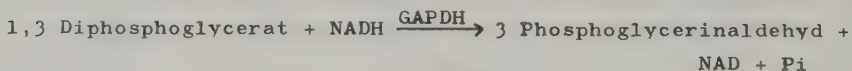
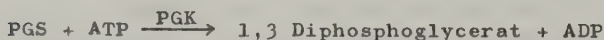
70 µl	TAA-Puffer	
10 µl	Ham	(18 mg/ml)
50 µl	ATP	(15,12 mg/ml)
50 µl	MgCl ₂	(5,07 mg/ml)

Mit 50 μ l Enzym wurde die Reaktion gestartet. Hamamelose, ATP und $MgCl_2$ lagen in TAA-Puffer gelöst vor. Wurde die Reaktion über die Messung radioaktiv markierter Ham verfolgt, so enthielt der Reaktionsansatz zusätzlich 5 μ l einer Lösung von radioaktiv markierter Ham. Eine Aktivität von etwa 15 000 dpm war nötig, um eine hinreichende Meßgenauigkeit zu erzielen.

Nach Abstoppen der Reaktion konnte dann entweder das gebildete Ham 2^1 -P oder der Verbrauch von ATP bestimmt und so die Umsatzrate errechnet werden.

3.2.1.1. Bestimmung des verbrauchten ATP

Sollte nach erfolgter Reaktion das verbrauchte ATP aus der Differenz zwischen eingesetztem und noch vorhandenem ATP bestimmt werden, so wurde die Reaktion durch 15 %ige (w:w) Trichloressigsäure terminiert, um eine Hydrolyse des ATP (z.B. durch Kochen) zu minimieren. Nach Abzentrifugieren des Präzipitats wurde dann in einem aliquoten Teil des Überstandes mit der Endwertmethode (31) der ATP-Gehalt bestimmt:



Die Messung des NADH-Verbrauchs erfolgte bei 334 nm. Die Rate wurde nach der Formel (1) errechnet. Davon wird die in der Referenzküvette, in der der ATP-Verbrauch eines Reaktionsansatzes ohne Hamamelose gemessen wird, beobachtete Rate abgezogen.

$$\text{Rate } \left[\frac{nM}{min} \right] = \frac{[ATP]_A - [NADH]_V}{t} \quad (1)$$

- $[ATP]_A$: Menge des am Anfang eingesetzten ATP (in nM)
- $[NADH]_V$: Menge des verbrauchten NADH; diese entspricht direkt der Menge des in der Ham-Kinasereaktion nicht umgesetzten ATP (in nM)
- t : Reaktionsdauer in Minuten
- Rate : nM umgesetzte Ham pro Minute

Die so errechnete Rate ist in mUnits ausgedrückt, wobei 1 U diejenige Enzymaktivität ist, die 1 μ Mol Substrat pro Minute umsetzt.

3.2.1.2. Bestimmung des gebildeten Ham 2^1 -P

Da Trichloressigsäure die Auftrennung von Ham und Ham 2^1 -P bei der Hochspannungselektrophorese stört, wurde in diesem Fall die Reaktion durch 5-minütiges Erhitzen auf 100°C beendet. Nach Abzentrifugieren des denaturierten Proteins wird der Überstand gefriergetrocknet und der Hochspannungselektrophorese unterworfen. Um anschließend die Menge an gebildetem Ham 2^1 -P bestimmen zu können, muß die eingesetzte Hamamelose radioaktiv markiert sein. Durch Zugabe von radioaktiv markierter Hamamelose zu bekannten Mengen nicht markierter Hamamelose konnte die gewünschte spezifische Aktivität der Hamamelose eingestellt werden. Die Umsatzgeschwindigkeit wurde dann nach der Gleichung (2) ermittelt:

$$\text{Rate } [\text{mU}] = \frac{\text{cpm Ham } 2^1\text{-P} \times [\text{Ham}]_A}{(\text{cpm Ham} + \text{cpm Ham } 2^1\text{P}) \times t} \quad (2)$$

- cpm Ham 2^1 -P: Impulse pro Minute von Ham 2^1 P
- cpm Ham : Impulse pro Minute von Ham
- $[\text{Ham}]_A$: eingesetzte Hamamelosemenge (in nM)
- t : Reaktionsdauer (in min)

3.2.1.3. Genauigkeit der Bestimmungsmethoden

Trayser und Colowick (32) hatten gezeigt, daß selbst sechsfach umkristallisierte Hefehexokinase ATPase Aktivität aufweist. Da letztere z.B. durch N-Acetylglucosamin, einen zu Glucose kompetitiven Inhibitor, teilweise gehemmt werden kann, kamen sie zu dem Schluß, daß die ATPase Aktivität eine Eigenschaft der Hexokinase selbst ist. Nach Zewe et al. (30) resultiert diese ATPase Aktivität aus der Übertragung von Phosphat aus ATP auf ein Wassermolekül, das im aktiven Zentrum der Hexokinase die Stelle besetzt, die normalerweise vom Hydroxylrest des C-Atoms 6 der Hexose eingenommen wird. Da die Bestimmung der Umsatzrate der Ham-Kinase über die Messung des ATP-Verbrauchs einerseits und über die des gebildeten Ham 2^1 -P andererseits etwas abweichende Werte ergab, lag es nahe, zu überprüfen, ob nicht auch die gereinigte Ham-Kinase ATPase Aktivität besitzt und somit eine Aktivitätsbestimmung über den ATP-Verbrauch generell zu hohe Werte liefert. Im positiven Falle müßte dann diese Bestimmung korrigiert werden.

In einem Reaktionsansatz ohne das Substrat Hamamelose wurden deshalb steigende Mengen MgATP^{2-} mit jeweils der gleichen Enzymmenge für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit TCA wurde das verbrauchte ATP wie unter 3.2.1.1. beschrieben, bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 4 dargestellt. Hamamelosekinase kann, ebenso wie Hefehexokinase, ATP hydrolysieren. Die Reaktionsgeschwindigkeit weist ein Optimum zwischen 5 und 6 mM MgATP^{2-} auf. Ab 6,5 mM MgATP^{2-} tritt starke Substrathemmung auf und ab 8,7 mM MgATP^{2-} liegt totale Hemmung der ATPase Reaktion vor. Die K_m für MgATP^{2-} wurde aus dem Michaelis-Menten-Plot (bei halber Maximalgeschwindigkeit) abgeschätzt ($K_m \approx 2 \text{ mM ATPMg}^{2-}$).

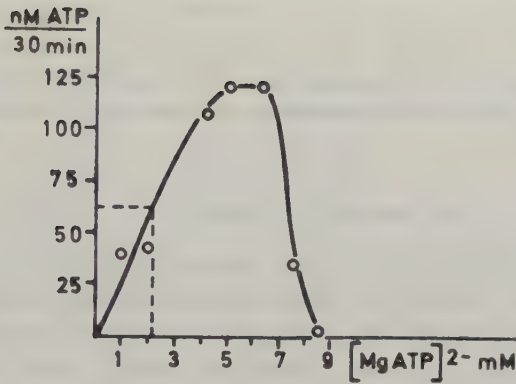


Abb. 4: Abhängigkeit der Geschwindigkeit der ATPase-Reaktion der Hamamelosekinase von der $(\text{MgATP})^{2-}$ -Konzentration.

Die K_m wurde über die $\frac{V_{\max}}{2}$ abgeschätzt:

$$K_m(\text{MgATP})^{2-} \approx 2 \text{ mM.}$$

Diese Beobachtung erklärt den Befund, daß die Bestimmung der Umsatzraten der Ham-Kinase differierten, wenn Parallelansätze mit den beiden Meßmethoden verglichen wurden. Eine exakte quantitative Ermittlung der Enzymaktivität durch die Messung des ATP-Verbrauchs im Reaktionsansatz ist also nicht möglich. Alle kinetischen Daten zur Charakterisierung der Ham-Kinase müssen daher, soweit sie das Substrat Hamamelose betreffen, über das Verfahren mit radioaktiv markierter Hamamelose ermittelt werden. Die Methode mit Hilfe der ATP-Bestimmung ist jedoch im optimierten Reaktionsansatz als Schnelltest, z.B. zur Aktivitätsüberprüfung bei den einzelnen Stufen der Anreicherung geeignet, wie ein Vergleich mit der Umsetzung radioaktiv markierter Hamamelose zeigte.

3.2.2. Stabilität der Hamamelose-Kinase

Gereinigte Ham-Kinase ist äußerst instabil. Lediglich im (mit 0,1 mM DTE versetzten) Rohextrakt bleibt der Aktivitätsabfall bei Aufbewahrung bei -20°C für 1-2 Monate unter 10 %. Dies gilt aber nur, wenn der Rohextrakt sofort nach der Isolierung eingefroren wird. Da wiederholtes Einfrieren und Auftauen ebenfalls rapiden Aktivitätsabfall bewirkt, erwies es sich als zweckmäßig, den Rohextrakt im Anschluß an die Isolierung in aliquote Portionen (ca. 5 ml) aufzuteilen und diese getrennt einzufrieren. Wird der Rohextrakt bei 4°C aufbewahrt, so läßt sich nach drei Tagen keine Hamamelosekinase-Aktivität mehr nachweisen. Diesen raschen Aktivitätsverlust findet man auch während der ganzen Anreicherungsprozedur, wobei beim hochgereinigten Enzym selbst eine Lagerung bei -20°C nicht vor einem vollständigen Verlust der Aktivität innerhalb von 2 Wochen schützt. Die für Enzymstabilisierung gängigen Methoden (s.Tab.1) brachten bis auf eine Ausnahme keinen Erfolg: Nur nach Substratzugabe (Hamamelose) blieb die Aktivität erhalten. Unerläßliche

Voraussetzung dafür ist jedoch eine relativ hohe Enzymkonzentration in der gereinigten Fraktion (Abb.5). Da aber die zur Stabilisierung zugegebene Hamamelose bei verschiedenen Untersuchungen, wie z.B. Bestimmung der K_m , stört, die Entfernung dieses Substrats durch Dialyse aber wieder zum Aktivitätsverlust führt, wurden in solchen Fällen nur kleinere Mengen des Enzyms präpariert und sofort im gewünschten Test eingesetzt.

Tab.1:

Versuche zur Stabilisierung der Ham-Kinase durch Zugabe stabilisierender Agentien in verschiedenen Konzentrationen (Zusatz jeweils nach der Anreicherung)

- o : keine Änderung gegenüber dem Kontrollansatz
- : schneller Verlust der Aktivität
- : sofortiger Aktivitätsverlust
- + : Stabilisierung

Zusatz für die Stabilisierung	Molarität im Ansatz	Ergebnis
DTE	0,1 mM	o
DTE	0,5 mM	o
DTE	1,0 mM	o
DTT	0,1 mM	o
DTT	0,5 mM	o
Mercaptoäthanol	0,1 mM	-
Mercaptoäthanol	1,0 mM	-
Glycerin	1,0 mM	o
BSA	1 mg/ml	o
BSA	10 mg/ml	o
Brij	10 ⁻³ mM	--
Hamamelose	4 mM	+

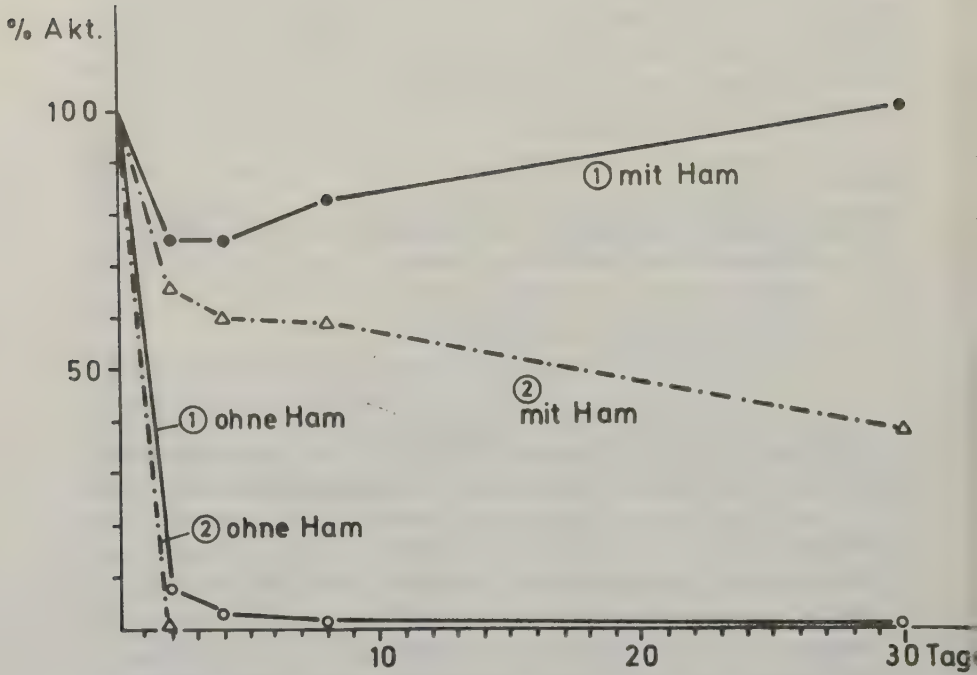


Abb. 5: Stabilisierung der Hamamelosekinase durch Substrat.

— hohe Enzymkonzentration ($\sim 0,2$ Units/ml)
- - - - - geringe Enzymkonzentration ($\sim 0,04$ Units/ml)

Die Aktivität nach der Isolierung wurde gleich 100 % gesetzt.

3.2.3. Anreicherung der Hamamelosekinase

3.2.3.1. Reinigungsschritte

Die Versuche zur Anreicherung gingen von 10 ml des wie unter 2.7.2. beschrieben hergestellten und dialysierten (siehe 2.9.) Rohextraktes aus. Bei der Dialyse ergab sich bereits eine Anreicherung um den Faktor 2.

Ammoniumsulfatfällung:

Festes, fein zerriebenes Ammoniumsulfat wurde langsam und portionsweise unter stetigem Rühren zum dialysierten Rohextrakt zugegeben, bis eine 45 %ige Sättigung der Lösung erreicht war. Nach zweistündigem Rühren wurde der Niederschlag, der die gesamte Ham-Kinase enthielt, 20 Minuten lang bei 45 000 g abzentrifugiert und in TAA-Puffer (0,1 M; pH 7,5; 0,1 mM DTE) aufgenommen. Nach zweistündiger Dialyse gegen destilliertes Wasser (4°C; 0,1 mM DTE) konnte die Proteinfraction dann der Säulenchromatographie unterworfen werden.

Der Überstand der Ammoniumsulfatfraktionierung wies keinerlei Ham-Kinaseaktivität mehr auf.

Erste Chromatographie an DEAE-Cellulose:

4 g DEAE-Cellulose (Serva) wurden zum Equilibrieren mit 50 ml TAA-Puffer (0,1 M; pH 7,5; 0,1 mM DTE) geschüttelt. Nach 45-minütigem Stehen wurden die nicht sedimentierten Schwebeteilchen abdekantiert und der Vorgang wiederholt. Für das Beladen der Säule (Glassäule, 15 cm lang, 1,3 cm Ø mit abschließender Tonfritte, die mit Filterpapier abgedeckt wurde) erwies es sich als vorteilhafter, die equilibrierte DEAE-Cellulose direkt mit der zu trennenden Probe zu versetzen und erst nach dem Vermischen die Säule zu gießen. Die Menge des zugegebenen Proteins richtete sich nach der

Kapazität der DEAE-Cellulose, die bei etwa 10 % des Trockengewichts liegt. (Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (34)). Die so hergestellte Säule wurde zur Stabilisierung des Säulenbetts 6 Stunden lang mit TAA-Puffer gewaschen ($\sim 0,25$ ml/min). Die Elution der Hamamelosekinase erfolgte sodann unter Verwendung eines linearen KCl Gradienten (hergestellt aus 100 ml TAA-Puffer und 100 ml TAA-Puffer, der 0,5 molar KCl enthält). Das Enzym wird bei einer Konzentration zwischen 0,1 - 0,2 m KCl eluiert (siehe Abb. 6).

Vor dem anschließenden Funktionstest mußten die Hamamelosekinase enthaltenden Fraktionen konzentriert (vgl. 2.8.) und anschließend durch Dialyse vom KCl befreit werden.

Zweite Chromatographie an DEAE-Cellulose:

Die so erhaltene Fraktion wurde dann auf eine weitere DEAE-Cellulose-Säule von 1 ml Bettvolumen aufgetragen, die vorher eine Stunde lang mit TAA-Puffer equilibriert worden war. Hamamelosekinase wurde dann unter Verwendung eines sehr flachen linearen KCl-Gradienten in TAA-Puffer (je 20 ml TAA-Puffer mit 0,15 bzw. 0,20 molar KCl) von der Säule eluiert. Bei diesem Reinigungsschritt enthielten die ersten 10 ml Eluat Hamamelosekinase ohne Glucosekinaseaktivität (siehe 3.2.3.2. und Diskussion 4.1.). Die Lösung wurde wiederum im Diaflo konzentriert. Die Disc-Gelelektrophorese der gereinigten Enzymfraktion auf Polyacrylamid zeigte nur mehr zwei Banden, von denen eine deutlich dominierte.

Tabelle 2 gibt die Anreicherung bei den einzelnen Schritten an. Bei den Angaben über die spezifische Aktivität ist zu berücksichtigen, daß ein Teil der Aktivität während der Anreicherung, bedingt durch die Zeitdauer, verloren geht.

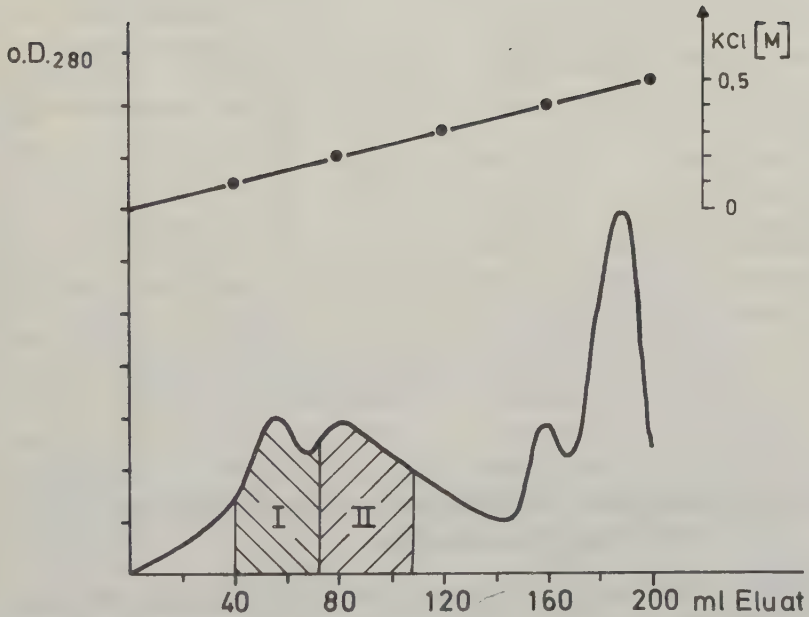


Abb. 6: Chromatographie der Hamamelosekinase an DEAE-Cellulose. (Die durchgezogene Linie gibt die Absorption gemessen bei 280 nm an.)

I+II: Über diesen Bereich erstreckt sich die Elution der Hamamelosekinase.

I : Ham-Kinase überwiegt über Glucokinase.

II : Glucokinase überwiegt über Ham-Kinase.

Die Gerade im oberen Teil gibt den Verlauf des KCl-Gradienten an.

Gesammelt wurde in Fraktionen von 4 ml.

Tab.2:

Anreicherung der Hamamelosekinase (bezogen auf die Aktivität im Rohextrakt aus 1,5 l Bakteriensuspension).

Reinigungsschritt	Gesamt units	Ausbeute %	spez.Ak- tivität mU/mg	Anrei- cherung
Rohextrakt	2,66	100	0,85	1
Dialyse	2,4	90	1,65	2
Ammoniumsulfat- fällung	1,97	74	2,5	3
1.DEAE Celluloses.	0,96	36	186	218
2.DEAE Celluloses.	0,58	21	650	760

3.2.3.2. Ermittlung der Kinaseaktivitätsverteilung im Eluat
nach Säulenchromatographie

Wegen des geringen Proteingehalts in den einzelnen, nach der Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose erhaltenen Fraktionen war es auch nach Konzentrierung nicht möglich, Ham-Kinaseaktivität in diesen Fraktionen nachzuweisen. Die Fraktionen wurden deshalb bereichsweise vereinigt und konzentriert. Durch entsprechende Bereichsüberschneidungen bei der Vereinigung der Fraktionen konnte die Lage der Ham-Kinaseaktivität im Elutionsdiagramm ermittelt werden. Die in Abb.6 eingezeichneten Bereiche I und II enthielten Hamamelosekinase. Gleichzeitig war aber auch Glucokinase in diesen Fraktionen enthalten. Aus Tab. 3 ist jedoch zu ersehen, daß das Maximum der Hamamelosekinase etwas eher von der Säule eluiert wird als das der Glucokinase.

Tab. 3:

Verhältnis der spezifischen Aktivitäten für Ham und Glc in Abhängigkeit vom KCl Gradienten.

Elutionsbereich	spez. Akt. Glc Kinase
	spez. Akt. Ham Kinase
I + II	0,6
I	0,2
II	1,3

Die Fraktion I wurde für die zweite Chromatographie an DEAE-Cellulose verwendet. Versuche, die beiden Enzymaktivitäten auf anderem Wege zu trennen (z.B. Hydroxylapatit, wie es für die P I und P II Isozyme der Hexokinase (35) verwendet wurde) führten bei Hamamelosekinase zu 100 %igem Aktivitätsverlust; Glucokinase dagegen war stabil.

3.2.4. Charakterisierung der Hamamelosekinase

3.2.4.1. Molekulargewicht

Abschätzungen des Molekulargewichtes durch Chromatographie an Sephadex G-200 (27) ergaben ein Molekulargewicht von 50 000.

3.2.4.2. Substratspezifität

Hamamelosekinase scheint streng spezifisch für Hamamelose zu sein. Von den untersuchten Zuckern (Tab.4) konnte nur Hamamelose phosphoryliert werden. Wie schon beschrieben (3.2.1.3.) kann auch ATP allein als Substrat fungieren.

Außer mit Ham, Glc und Fru, die radioaktiv markiert zur Verfügung standen, wurden die Untersuchungen auf Substratspezifität über die Ermittlung der verbrauchten ATP-Menge durchgeführt. Eine exakte und absolut eindeutige Aussage ist aber mit dieser Methode nicht möglich (vgl. 3.2.1.3).

Nur im Fall der L-Arabinose und der L-Glucose zeigte der Testansatz gegenüber dem Referenzwert einen geringfügigen Mehrverbrauch an ATP während der Reaktion. Möglicherweise handelt es sich jedoch lediglich um eine Stimulierung der ATPase Aktivität, wie sie Dela Fuente und Sols für D-Lyxose und D-Xylose, die beide nicht phosphoryliert werden können, bei Hefehexokinase gezeigt haben (37). Eine eindeutige Klärung könnte nur über den Einsatz radioaktiv markierter Substrate erfolgen.

Tab.4:

Substratspezifität von Hamamelosekinase (alle Zucker 4,24 mM)

- ++ eindeutig positive Reaktion
- + schwach positive Reaktion
- kein ATP-Verbrauch

D-Hamamelose	++	L-Arabinose	+
D-Glucose	-	D-Mannose	-
L-Glucose	+	Saccharose	-
D-Glucosamin	-	Laktose	-
D-Fructose	-	Maltose	-

3.2.4.3. pH-Optimum

Sowohl die ATPase- als auch die Phosphorylierungsreaktion der Hamamelosekinase weisen bei pH 7,5 ein Optimum auf (Abb.7). Für die Stabilität des Enzyms ist es jedoch günstiger, wenn Aufschluß der Bakterien und die anschließende Lagerung des Rohextraktes (bei -20°C) bei einem pH-Wert von 6,4 erfolgen.

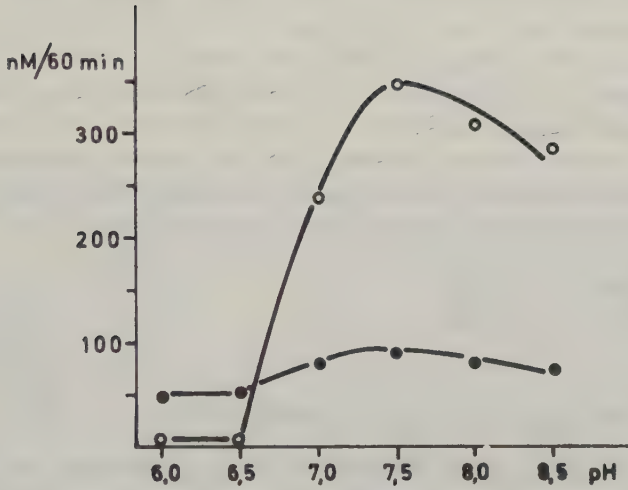


Abb. 7: pH-Optimum der Hamamelosekinase.

- Kinasereaktion
- ATPase-Reaktion

3.2.4.4. Kinetische Daten

Die Hamamelosekinasereaktion unterliegt einer deutlichen Substrathemmung, sowohl mit MgATP^{2-} als auch mit Hamamelose (Abb. 8 und 9). Während die ATPase-Reaktion bei einer Konzentration von 8,7 mM MgATP^{2-} nicht mehr abläuft, liegt bei dieser Konzentration erst eine 25 %ige Hemmung der Kinasereaktion vor ($\text{Ham} = 4,24 \text{ mM}$).

Eine Hemmung der Hamamelosekinase durch Hamamelose tritt bei einem Konzentrationsverhältnis $\text{ATP} : \text{Mg} = 1 : 1$ ($= 5,31 \text{ mM}$) ab einer Konzentration von etwa 5 mM auf. Unter optimalen Reaktionsbedingungen ergeben sich folgende K_m -Werte für die Kinasereaktion :

$$K_m^{\text{ATP}} = 2,5 \text{ mM}$$

$$K_m^{\text{Ham}} = 3 \text{ mM}$$

3.2.4.5. Mg^{2+} als Effektor der Kinasereaktion

Über die Art der in vivo Regulation der Hefehexokinasen gibt es bisher nur wenig Untersuchungen, während Hexokinase aus Säugetieren diesbezüglich schon genauer erforscht ist (28). Wie alle nucleotidabhängigen Phosphotransferasen benötigen auch die Hexokinasen den 1:1-Komplex eines zweiwertigen Metallions mit einem Nucleotid zur Phosphorylierung des Substrats. Sowohl freies Nucleotid als auch freies Metallion sind im allgemeinen Inhibitoren der Reaktion (51). Über dieses allgemeine Phänomen der Substrathemmung hinaus weisen Befunde auf eine zusätzliche regulatorische Rolle des Mg^{2+} bei Hefe- und Säugerhexokinasen hin (38, 43, 49; siehe auch Diskussion).

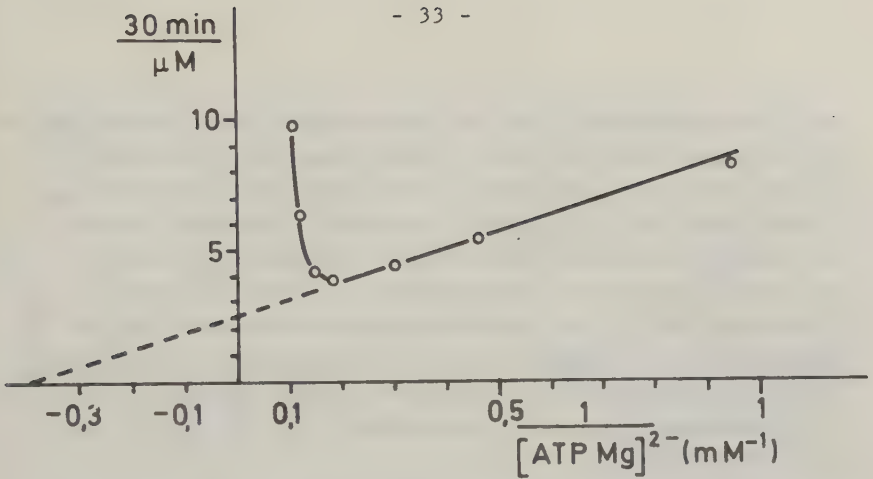


Abb. 8: Bestimmung der $K_m(\text{MgATP})^{2-}$ für die Kinase-
reaktion nach Lineweaver und Burk
 $K_m(\text{MgATP})^{2-} = 2,5 \text{ mM}$. (Enzym jeweils 0,01 Unit)

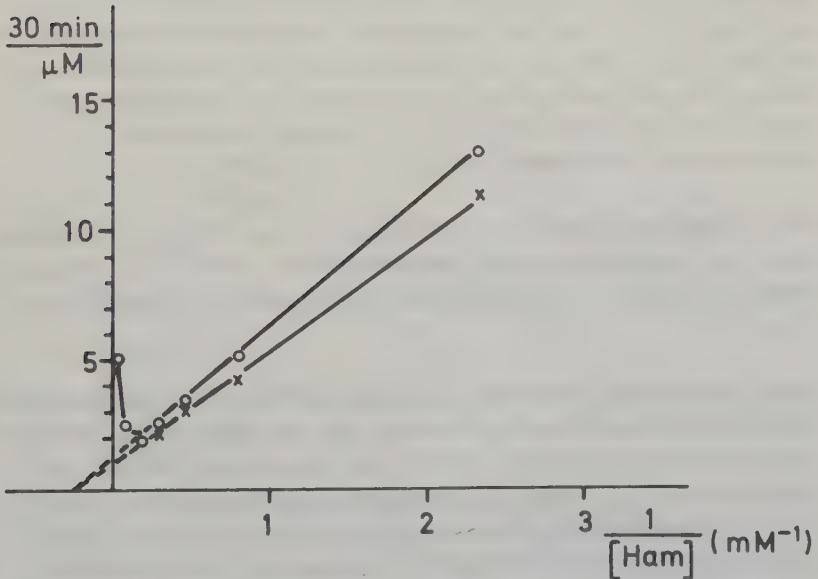


Abb. 9: Bestimmung der $K_m(\text{Ham})$ von Hamamelosekinase

○—○ ATP : Mg = 1 : 1
 x—x ATP : Mg = 5 : 6
 $K_m(\text{Ham}) = 3 \text{ mM}$
 (je 0,015 Units Enzym wurden eingesetzt)

In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob Hamamelosekinase neben Substrathemmung durch Hamamelose und MgATP^{2-} (Abb. 8 und 9) möglicherweise auch einer zusätzlichen Regulation durch Mg^{2+} unterliegt. Kosow und Rose (38) zeigten, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bei Isozym B (= P II) von Hefehexokinase in Abhängigkeit von MgATP^{2-} sigmoiden Kurvenverlauf in der Michaelis-Menten-Auftragung ergibt, wenn freies Mg^{2+} im Überschuß im Reaktionsansatz vorliegt. Voraussetzung für diese Sigmoidität ist ein pH-Wert von $\leq 7,3$ des Reaktionsansatzes. Im alkalischen (pH 7,9) ergibt sich eine hyperbolische Kurve.

Bei Hamamelosekinase erhält man auch im leicht basischen pH-Optimum (pH 7,5) einen sigmoiden Kurvenverlauf in der Michaelis-Menten-Auftragung, wenn bei optimaler, konstanter Hamamelosekonzentration (4,24 mM) die MgATP^{2-} -Konzentration gesteigert wird (Abb. 11). Wird bei optimalen, konstanten Konzentrationen von ATP (5,31 mM) und Ham (4,24 mM) die Mg^{2+} -Konzentration allein erhöht, so ergibt sich ein ähnlicher Kurvenverlauf (Abb. 10). In beiden Fällen tritt dieses Phänomen im suboptimalen Konzentrationsbereich von MgATP^{2-} auf.

Bei suboptimalen Hamamelosekonzentrationen bewirkt freies Mg^{2+} über das stöchiometrische Verhältnis $\text{Mg} : \text{ATP} = 1 : 1$ hinaus im Reaktionsansatz eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit (Abb.9).

Eine überoptimale Konzentration von Mg^{2+} hat bei Hamamelosekinase keinen signifikanten Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit, wenn das Enzym mit ATP und Ham gesättigt ist. Mg^{2+} -Überschuß bis zu einem stöchiometrischen Verhältnis $\text{ATP} : \text{Mg} \approx 1 : 3$ hemmt die Ham-Kinasereaktion nicht (Abb.12). Eine 12 mM Konzentration von MgATP^{2-} dagegen hat schon deutlich hemmende Wirkung auf die Reaktionsgeschwindigkeit (Abb.8).

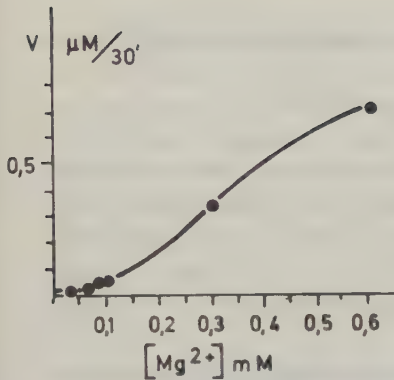


Abb. 10:

Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Kinasereaktion von der Mg^{2+} -Konzentration.

(ATP) = 5,31 mM

(Ham) = 4,24 mM

(Enzym: 0,015 Units)

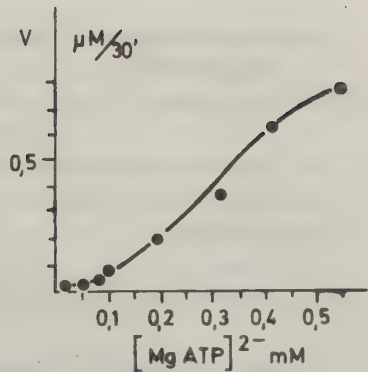


Abb. 11:

Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Kinasereaktion von der $(MgATP)^{2-}$ -Konzentration.

(Ham) = 4,24 mM

(Enzym: 0,015 Units)

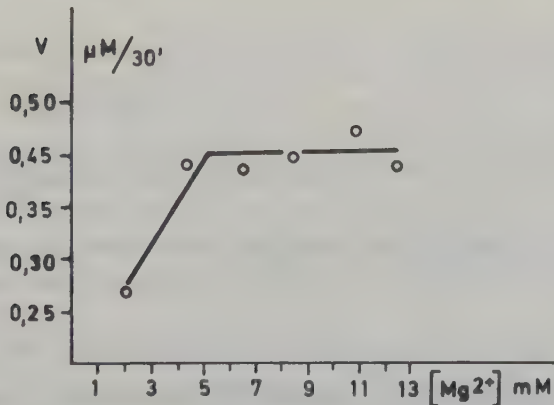


Abb. 12:

Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Kinasereaktion von Mg^{2+} bei Sättigung des Enzyms mit Ham (4,24 mM) und ATP (5,31 mM).

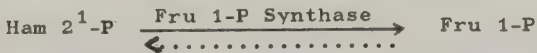
(Ab 5,31 mM liegt Mg^{2+} in überoptimaler Konzentration vor.)

(Enzym: 0,015 Units)

3.3. Fructose 1-phosphat-Synthase (Hamamelose 2¹-phosphat-aldehydlyase)

3.3.1. Nachweis der enzymatischen Aktivität

Die Fructose 1-phosphat-Synthase katalysiert den 2. Schritt der in Abb. 1 wiedergegebenen Sequenz des Hamamelose-katabolismus



Prinzipiell gibt es für die Bestimmung dieser Reaktionsrate zwei Möglichkeiten. Es kann das gebildete Fru 1-P oder das verbrauchte Ham2¹-P bestimmt werden. Durch Einsatz von radioaktiv markiertem Ham2¹-P bekannter spezifischer Aktivität können Ausgangs- und Endprodukt im gleichen Verfahren erfaßt werden. Um nicht radioaktiv markiertes Fru 1-P bestimmen zu können, benötigt man Fru 1-P-Kinase. Diese konnte ebenfalls aus *Kluyvera citrophila* isoliert werden (3.4.). Damit war die Möglichkeit zur Durchführung eines schnellen optischen Tests für die Synthaseaktivität gegeben.

Für eine kontinuierliche spektrophotometrische Messung der Rate war die Aktivität jedoch zu gering (vgl. Diskussion 4.1.) Daher wurde auch in diesem Falle die Methode des "stop-time assay" gewählt. Ham2¹-P wurde in TAA-Puffer (0,1 M; pH 7,5; 0,1 mM DTE) 30' bei 30°C im Wasserbad mit dem Enzym inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Erhitzen auf 100°C terminiert. Nach Abzentrifugieren des denaturierten Proteins wurde im Überstand der Anteil der einzelnen Reaktionspartner bestimmt.

3.3.1.1. Bestimmung der Fru 1-P-Synthaseaktivität mit der ¹⁴C-Methode

Nach Denaturierung und Abzentrifugieren des Proteins wurde der Überstand lyophilisiert und anschließend der Hoch-

spannungselektrophorese im Ammoniumformiatpuffer unterworfen. Die die Zuckermorphosphate enthaltende Bande wurde eluiert und die Substanzen nach Gefriertrocknung mit saurer Phosphatase (~ 1 U in Citratpuffer pH 5,2, 12 Stunden bei 30°C im Brutschrank über Chloroform) dephosphoryliert. Fructose und Hamamelose wurden durch zweimalige eindimensionale Chromatographie im Fließmittelgemisch II getrennt. Ihre Lokalisation erfolgte durch Radioautographie oder mit der Beta-Camera. Die Aktivität der Synthase kann nach Formel (3) errechnet werden.

$$A = \frac{\text{cpm Fru}}{\text{cpm total}} \times 100 \quad (3)$$

A : umgesetztes Hamamelosephosphat (in %)

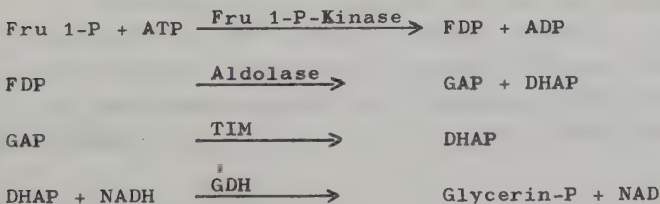
cpm Fru: Impulse pro Minute von ^{14}C -Fru 1-P

cpm total: gesamte ^{14}C -Aktivität des Pherogramms.

Wenn der Rohextrakt auf Synthaseaktivität geprüft wurde, so fanden sich nach der Hochspannungselektrophorese radioaktive Substanzen auch am Start und bei einem R_{Pikrat} -Wert von 1,5. Geht man davon aus, daß diese auch aus F-1-P entstanden sein könnten, so ist die nach Formel (3) berechnete Synthaseaktivität eine Mindestaktivität.

3.3.1.2. Bestimmung der Fru 1-P-Synthaseaktivität im optischen Test

Anderson et al. (49) geben folgende Testkombination für Fru 1-P-Kinase an:



Die Reaktion kann mit Fru 1-P-Kinase oder mit Fru 1-P gestartet werden. Für die Aktivitätsbestimmung der Fru 1-P-Synthase wurde wie folgt vorgegangen :

- (1) Ham + ATP $\xrightarrow{\text{Ham-Kinase}}$ Ham 2¹-P (+ nicht umgesetzte Ham)
+ ADP
- (2) Ham 2¹-P + (Ham) $\xrightarrow{\text{Fru 1-P-Synthase}}$ Fru 1-P + (Ham)
- (3) Fru 1-P $\xrightarrow{\text{siehe oben}}$ → Glycerinphosphat

Mit der angereicherten Hamamelosekinase wurde Ham 2¹-P dargestellt (1). Das entstehende Gemisch aus Ham 2¹-P und nicht umgesetzter Ham wurde nach Aufkochen und Abzentrifugieren des so denaturierten Proteins mit Synthase 30 min lang bei 30°C inkubiert (2). Auch dieser Ansatz wurde dann zur Terminierung 10 min lang auf 100°C erhitzt, um eine vollständige Hydrolyse des noch vorhandenen ATP zu erzielen. Nach dem Abzentrifugieren des Proteins konnte der Überstand im Test eingesetzt werden (3).

Die Bestimmung mit dem optischen Test eignet sich als qualitativer Schnelltest für die Aktivitätsbestimmung bei der Anreicherung. Exakte Ratenbestimmungen mußten jedoch über den langwierigen Test mit radioaktiv markierten Verbindungen erfolgen, da das pre steady state Verhalten der Fru 1-P-Kinase (s. 3.4.4.2.) eine genaue quantitative Bestimmung des Fru 1-P mit der Endwertmethode nicht zuläßt.

3.3.2. Nachweis der Synthaseaktivität im Rohextrakt

Wurde der Rohextrakt aus Bakterien der logarithmischen Wachstumsphase bereitet, gelang es nicht, Fru 1-P-Synthaseaktivität nachzuweisen. Selbst in sehr langen Reaktionszeiten wurde Ham 2¹-P nicht umgesetzt. Erst als die Bakterien aus der stationären Phase (Abb. 13: E₂) geerntet und aufgeschlossen

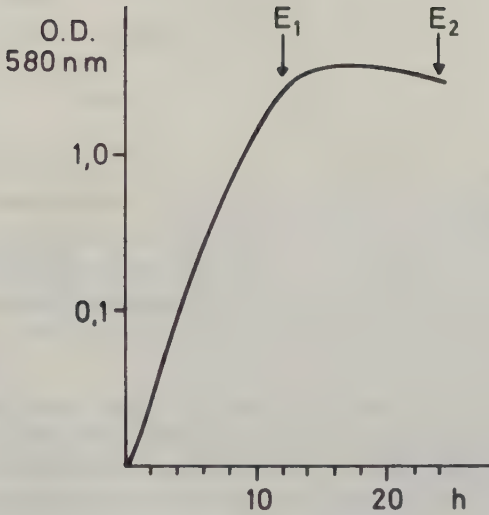


Abb. 13: Wachstumskurve von *K.citrophila* in Nährlösung II.

E₁ : Zeitpunkt der Ernte für Ham-Kinase und Fru 1-P-Kinase

E₂ : Zeitpunkt der Ernte für Fru 1-P-Synthase.

wurden, zeigte sich im Rohextrakt Synthaseaktivität. Hierfür war allerdings zusätzlich noch das Vorliegen von freier Hamamelose im Reaktionsansatz erforderlich. Üblicherweise wurde folgender Ansatz verwendet:

10 µl Hamameloselösung	(18 mg/ml)
50 µl Ham 2 ¹ -P-Lösung	($\approx$ 10 000 dpm)
50 µl Enzymlösung	
100 µl TAA-Puffer (0,1 M; pH 7,5; 0,1 mM DTE)	

Tab. 5 zeigt die verschiedenen Versuche zum Nachweis der Fru 1-P Synthaseaktivität im Rohextrakt. Schwache Fru 1-P-Synthaseaktivität kann ab einer Anzuchtzeit von 14 Stunden nachgewiesen werden, jedoch ist die Umsetzung mit einem Rohextrakt aus einer 24 Stunden alten Kultur wesentlich besser.

Die Tatsache, daß die Bakterien gerade während der log-Phase eine besonders aktive Fru 1-P-Synthaseaktivität benötigen, läßt den Befund, daß während dieser Phase im Rohextrakt diese Enzymaktivität nicht nachweisbar ist, unverständlich erscheinen. Es wäre allerdings denkbar, daß beim Homogenisieren ein Inhibitor freigesetzt wird, der die Reaktion in vitro hemmt. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde ein Rohextrakt mit Fru 1-P-Synthaseaktivität (aus einer 24 h alten Kultur) mit einem solchen ohne diese Aktivität (aus einer 12 h alten Kultur) versetzt. Wenn in letzterem die Fru 1-P-Synthase durch einen Hemmstoff inhibiert würde, so sollte auch die Fru 1-P-Synthase des "aktiven" Rohextraktes gehemmt sein. Tab. 5 zeigt das Ergebnis dieses Versuches: Statt 82 % des eingesetzten Ham 2¹-P wurden nun nur 57 % umgesetzt, was für die Existenz eines solchen Inhibitors spricht. Allerdings fällt auch auf, daß die Weiterreaktion zu anderen Verbindungen stark gehemmt wird.

Tab.5:

Nachweisbarkeit von Fru 1-P-Synthase im Rohextrakt (= RE; die Zahlen geben die Anzuchtzeit der Bakterien in Stunden an).

Enzym	Reaktions- dauer in Minuten	% der Gesamtradioaktivität		
		Ham 2 ¹ -P	Fru 1-P	Rest
RE 12	30	100	-	-
RE 12	60	100	-	-
RE 12	90	100	-	-
RE 12 + Ham	30	100	-	-
RE 12 + Ham	90	100	-	-
RE 14*	90	100	-	-
Re 14 + Ham	90	59	7	34
Re 24*	90	100	-	-
Re 24 + Ham	90	18	5,5	77,5
RE 24 + Ham + RE 12	90	43	12	45

* Manchmal im undialysierten RE auftretende Spuren (< 1%) von Fru 1-P-Synthase sind wohl auf die Wirkung von Resten an endogener Hamamelose zurückzuführen.

Wie Abb. 14 zeigt, treten bei der Verwendung eines Rohextraktes von Bakterien einer 24 Stunden alten Kultur neben Glucose noch sechs weitere Substanzen auf, während nach Zusatz von RE 12 nur noch Glucose nachweisbar ist. Entsprechend ist auch der prozentuale Anteil von Fructose höher als im Kontrollversuch.

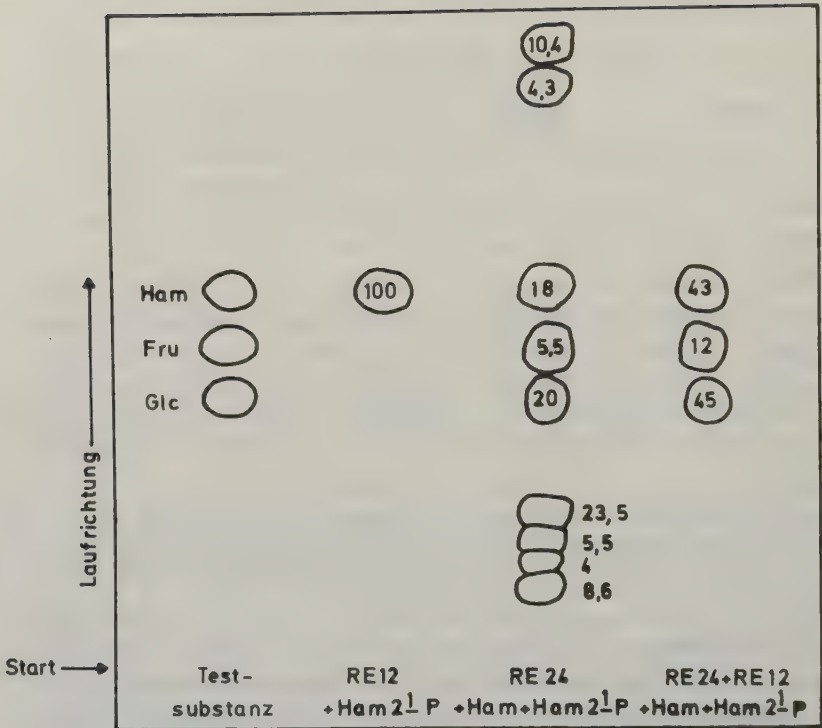


Abb. 14: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf dem Chromatogramm nach der Synthesereaktion mit unterschiedlichen Rohextrakten (Inkubationszeit 90 min).
 (Die Radioaktivität der Substanzen bei RE 24 + Ham 2¹-P + Ham war für eine Identifizierung zu gering.)
 In diesem Fall wurde von der Elektrophorese abgesehen und der gesamte Reaktionsansatz dephosphoryliert und chromatographiert.

3.3.3. Anreicherung der Fru 1-P-Synthase

Wenn, wie oben angenommen, die Nebenprodukte bei der Ham 2^1 -P-Umsetzung Folgeprodukte von Fru 1-P sind, sollten sie bei der Verwendung einer angereicherten Enzympräparation nicht mehr auftreten, da die Enzyme, die das Auftreten dieser Folgeprodukte bewirken, bei der Reinigung beseitigt werden müssen.

Ammoniumsulfatfällung:

10 ml des wie unter 2.7.2. beschrieben hergestellten und dialysierten Rohextraktes wurden zuerst der Ammoniumsulfatfällung unterworfen. Hierzu wurde unter stetigem Rühren portionsweise soviel festes Ammoniumsulfat zugegeben, bis die Konzentration einer zu 60 % gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung entsprach und danach noch zwei Stunden bei 4°C weitergerührt. Das ausgefallene Protein wurde 20 min lang bei 45 000 g abzentrifugiert, in 2 ml TAA-Puffer aufgenommen und wie beschrieben gegen aqua dest. dialysiert.

Chromatographie an Sephadex G-100:

Die auf diese Weise erhaltene Enzymfraktion wurde auf eine Sephadex G-100 Säule (80 cm lang; 1,5 cm Durchmesser) aufgetragen, die vorher mit TAA-Puffer (0,1 M; pH 7,5; 0,1 mM DTE) equilibriert worden war; dann wurde mit dem gleichen Puffer eluiert.

Die die Synthase enthaltenden Fraktionen wurden anschließend im Diaflo konzentriert. Abb. 15 zeigt das Elutionsdiagramm der Sephadex G-100 Säule. Die Fraktionen im schraffierten Bereich enthalten die Fru 1-P-Synthase. Die Lage der Aktivität wurde wie bei der Hamamelosekinase ermittelt (3.2.3.2.).

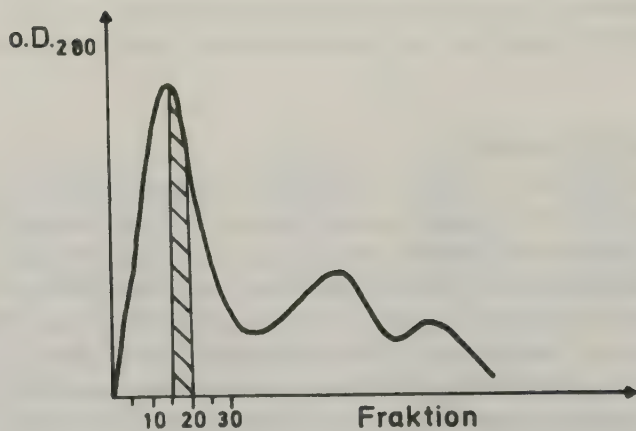


Abb. 15: Chromatographie der Fru 1-P-Synthase
an Sephadex G-100.
(Es wurden Fraktionen zu 1,5 ml ge-
sammelt.)

Chromatographie an Sephadex G-200

Die bei der 1. Säulenchromatographie erhaltene aktive Proteinfraction wurde in einem weiteren Reinigungsschritt an Sephadex G-200 chromatographiert (Säule: 75 cm lang; 3,5 cm Durchmesser; Elution mit TAA-Puffer bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 7 ml/Std.). Die Registrierung der Absorption bei 280 nm zeigte hierbei nur noch einen Peak. Diese Fractionen wurden anschließend im Diaflo eingeeengt (Abb.15a).

Tab. 7 gibt die Anreicherung an. Die angereicherte Fraction katalysiert nur noch die Umsetzung von Ham 2^1 -P zu Fru 1-P. Weitere Produkte konnten nicht mehr nachgewiesen werden. Auch diese gereinigte Fraction benötigt zusätzlich freie Ham im Reaktionsansatz, damit eine Umsetzung von Ham 2^1 -P erfolgt. Das Enzympräparat war mehrere Wochen bei -20°C ohne wesentlichen Aktivitätsverlust haltbar (Tab. 8).

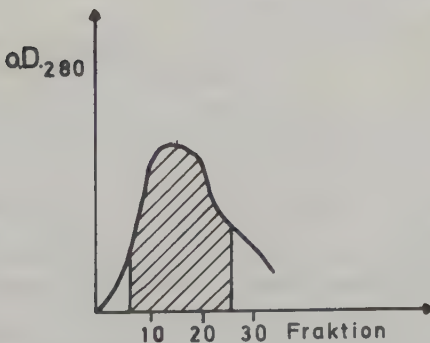


Abb. 15a: Chromatographie der Fru 1-P-Synthase an Sephadex G-200. Die Fractionen des schraffierten Bereiches enthalten das Enzym. (Fraktionsgröße: 2,5 ml)

Tab. 7:

Anreicherung der Fru 1-P-Synthase.

Reinigungsschritt	relative spezifische* Aktivität	Anreicherung
Rohextrakt	110	1
Fraktion nach Sephadex G-100	800	7,2
Fraktion nach Sephadex G-200	1142	10,4

* relative spezifische Aktivität = $\frac{\% \text{ umgesetztes Ham } 2^1\text{-P}}{\text{mg Protein}}$

Die Konzentration an Ham 2^1-P war unbekannt, aber immer gleich. Die Proteinmenge wurde nephelometrisch nach Ausfällen mit TCA ermittelt.

Tab. 8:

Umsetzungen mit der angereicherten Synthasefraktion. Ham 2^1-P hatte in allen Fällen die gleiche spezifische Radioaktivität. Reaktionsdauer : 90 min; Frakt. G 100 (200) bezeichnet die Enzymfraktion die nach Chromatographie an Sephadex G-100 (200) erhalten wurde.

Enzymfraktion	% des eingesetzten ^{14}C in	
	Ham 2^1-P	Fru 1-P
Frakt. G-100	100	0
Frakt. G-100 + Ham	52	48
Frakt. G-200	100	0
Frakt. G-200 + Ham	60	40
Frakt. G-100 nach 6 Wochen bei -20°C	56	44

3.3.4. Einstellung eines Reaktionsgleichgewichtes

Die angereicherte Fraktion lagerte zwar Ham 2^{14}-P nur zu Fru 1-P um, aber die Zeitkinetik ergab einen Effekt, der auf eine Gleichgewichtseinstellung bei der Synthesereaktion hindeutet, die nicht deutlich auf einer Seite liegt. Das Verhältnis von Ausgangs- und Reaktionsprodukt war nach 30 und nach 60 Minuten nahezu identisch. Durch Zugabe von gereinigter Fru 1-P-Kinase, ATP Mg und KCl (siehe 3.4.1.) zum Reaktionsansatz wurde versucht, durch Abziehen von Fru 1-P zum FDP die Umsetzung vollständiger ablaufen zu lassen. Es konnte jedoch nur eine nicht signifikante Steigerung des Umsatzes erzielt werden (Tab.9). Allerdings ergab sich bei Verwendung des Rohextraktes anstelle der angereicherten Proteinfraktion eine fast vollständige Umsetzung in Folgeprodukte (Tab.5).

Tab.9:

Zeitkinetik der prozentualen Verteilung des eingesetzten ^{14}C auf Ausgangs- und Endprodukt der Fru 1-P-Synthesereaktion. (Es wurde jeweils Ham 2^{14}-P gleicher spez. Aktivität verwendet.)

		Reaktionszeit		Zusätze
		30 min	60 min	
Frakt.G-100	Ham-P	44	42	-
	Fru-P	56	58	
Frakt.G-200	Ham-P	40	37	-
	Fru-P	60	63	
Frakt.G-100	Ham-P	44	37	Fru 1-P-Kinase MgATP ²⁻ KCl
	Fru-Pe	56	63	

3.4. Fructose 1-phosphat-Kinase

Thanbichler und Beck hatten das Auftreten von Fru 1-P beim Katabolismus der Hamamelose in *K. citrophila* aus dem Befund gefolgert, daß das gefundene Fructosemonophosphat nicht mit Fru 6-P identisch ist (10). Die Metabolisierung dieses Substrats könnte - von einer unspezifischen Phosphatasereaktion abgesehen - nach der heutigen Kenntnis des Stoffwechselgeschehens über zwei Wege geschehen:

1. Die direkte Umsetzung mit Aldolase zu GAP und freiem GA.

Es ist bekannt, daß FDP Aldolase (E.C. 4.1.2.13) auch direkt Fru 1-P als Substrat verwerten kann (48). Die V_{max} dieser Reaktion ist allerdings gegenüber der Aldolasereaktion mit FDP um den Faktor 10^3 geringer. (Diese Verhältnisse treffen für Class II Aldolase aus Hefe zu. Class I Aldolase und Ketose 1-phosphat Aldolase (E.C.4.1.2.7) die Fru 1-P mit größerer Geschwindigkeit spalten können, wurden bisher nicht in Bakterien nachgewiesen.) Die Fähigkeit von *K.citrophila*, auf Hamamelose als einziger Kohlenstoffquelle relativ gut zu wachsen, spricht wegen der geringen Umsatzrate von Fru 1-P durch Class II Aldolase allerdings gegen diesen Abbauweg.

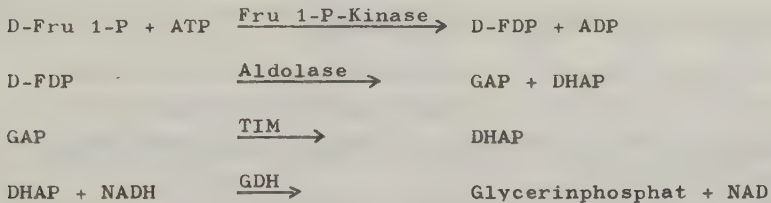
2. Die Phosphorylierung von Fru 1-P zu FDP.

Der zweite Weg des Fru 1-P-Metabolismus verläuft über die Phosphorylierung zum FDP, das dann glykolytisch weiter abgebaut werden kann. Damit ist aber die Existenz einer spezifischen Fru 1-P-Kinase in *Kluyvera citrophila* zu fordern. Hanson und Anderson (16) und Reeves et al. (15) hatten aus *Aerobacter aerogenes* und *Bacteroides symbiosis* bereits eine Fru 1-P-Kinase isoliert und angereichert. Sapico und Anderson haben dieses Enzym dann genauer charakterisiert (17, 50).

Es wurde daher in Anlehnung an die Methode von Anderson et al. (49) versucht, Fru 1-P-Kinase auch in *K. citrophila* nachzuweisen und eventuell zu isolieren. Damit könnte dann der Hamamelosekatabolismus von freier Ham zum FDP auch in vitro bewerkstelligt werden.

3.4.1. Nachweis der Enzymaktivität

Die Wirkung von Fru 1-P-Kinase kann kontinuierlich spektrophotometrisch bei 334 nm mit folgender Reaktionssequenz gemessen werden (49):



Der Testansatz war folgendermaßen zusammengesetzt: In eine Mikroküvette (1 ml mit 1 cm Lichtpfad) wurden pro Ansatz folgende Mengen einpipettiert:

50 µl Glycylglycin-NaOH-Puffer (0,4 M; , pH 7,5)
20 µl KCl (1,0 molar)
10 µl MgCl₂ (0,2 molar)
10 µl ATP (0,1 molar)
10 µl NADH (0,01 molar)
10 µl Fru 1-P (0,2 molar)
10 µl Aldolase
10 µl GDH/TIM
200 µl Wasser

Die drei Hilfsenzyme wurden in so hohen Konzentrationen eingesetzt, daß sie die Geschwindigkeit der Kinasereaktion nicht limitieren konnten. Die Reaktion wurde durch Zugabe

von Fru 1-P-Kinase gestartet. Bei der Untersuchung des pre steady state-Verhaltens der Fru 1-P-Kinase wurde allerdings mit NADH gestartet.

In einer Referenzküvette wurde die Hintergrundrate der NADH-Oxidation ermittelt, die von der Gesamtrate abgezogen wurde. Die Küvetten waren während der Messung auf 25°C thermostatisiert.

Mit diesem Testansatz konnte auch tatsächlich Fru 1-P-Kinase in *K. citrophila* nachgewiesen werden.

3.4.2. Anreicherung der Fru 1-P-Kinase

15 ml des wie unter 2.7. beschrieben hergestellten Roh-extraktes wurden zuerst der Ammoniumsulfatfällung (bei 60 % Sättigung) unterworfen und anschließend gegen aqua dest. dialysiert.

Chromatographie an Sephadex G-200

Die nach Ammoniumsulfatfällung erhaltene Proteinfraction wurde auf eine Sephadex G-200-Säule (75 cm lang; 3,5 cm Durchmesser) aufgetragen, die vorher mit TAA-Puffer equilibriert worden war. Das Proteingemisch wurde in Fraktionen zu 6,5 ml ($\hat{=}$ 99 Tropfen) bei einer Laufgeschwindigkeit von 7 ml/h mit TAA-Puffer von der Säule eluiert (Abb. 16). Die Lage der Fru 1-P-Kinase wurde wie bei der Hamamelosekinase ermittelt (3.2.3.2.). Die die Fru 1-P-Kinase enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und in der Ultrafiltrationszelle unter Verwendung einer PM 10 Membran konzentriert.

Chromatographie an Sephadex G-100 (Abb.17)

Die aus der G-200-Säule gewonnene Fraktion wurde dann auf eine mit TAA-Puffer equilibrierte Sephadex-G-100-Säule (90 cm x 1,5 cm) aufgetragen. Das Enzym wurde wiederum mit TAA-Puffer von der Säule eluiert und in 1,5 ml Fraktionen gesammelt.

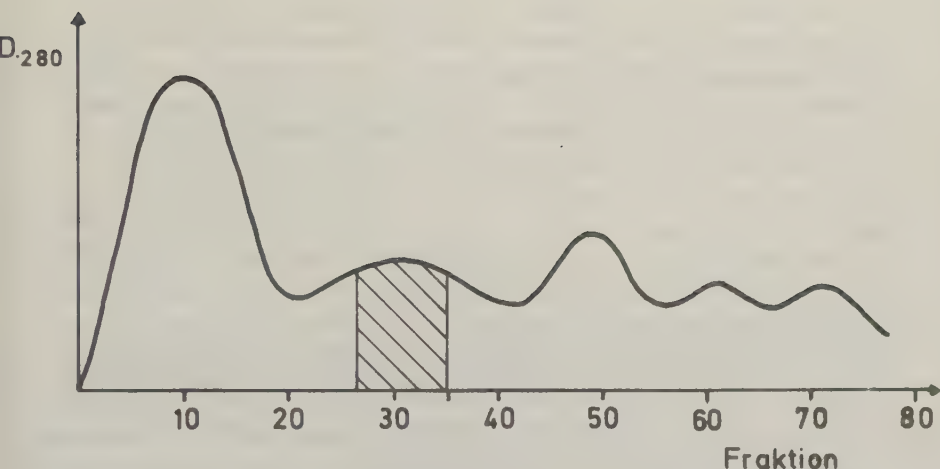


Abb. 16: Chromatographie der Fru 1-P-Kinase an Sephadex G-200.

Die Fraktionen im schraffierten Bereich enthalten die Fru 1-P-Kinaseaktivität. (Es wurden Fraktionen zu 6,5 ml gesammelt.)

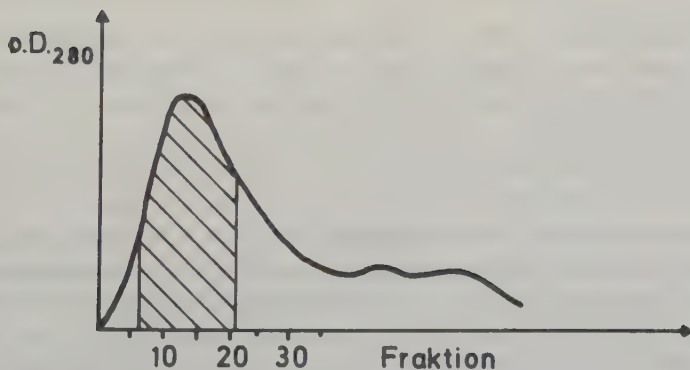


Abb. 17: Chromatographie der die Fru 1-P-Kinase enthaltenen Fraktionen (nach Chromatographie an Sephadex G-200) an Sephadex G-100.

Der schraffierte Bereich zeigt die Lage der Aktivität im Eluat an. (Es wurden Fraktionen zu 1,5 ml gesammelt.)

Die das gesuchte Enzym enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Diaflo eingengt.

In Tab. 10 sind die einzelnen Anreicherungs-schritte zusammengestellt. Das angereicherte Enzym ist bei -20°C über mehrere Monate stabil. Bei 4°C beträgt die Halbwertszeit etwa 6-7 Tage.

Tab. 10:

Anreicherung der Fru 1-P-Kinase.

(Eine Berechnung der vorhandenen Units für die Ermittlung der Ausbeute ist wegen der störenden NADH-Oxidaseaktivität im Rohextrakt und in der Ammoniumsulfatfraktion nicht möglich.)

Reinigungsschritt	spezifische Aktivität U/mg	Anreicherung
Rohextrakt	1,6	1
Ammoniumsulfatfraktion	2,2	1,4
Fraktion nach Sephadex G-200	37	23
Fraktion nach Sephadex G-100	68	42

Eine Schwierigkeit bei der Auffindung und Bestimmung der Aktivität des Enzyms im Rohextrakt und in der durch Ammoniumsulfat gefällten Fraktion stellt der hohe Gehalt an NADH-Oxidase dar. Da in der Referenzküvette nahezu die selben Raten des NADH-Verbrauchs gemessen werden, wie in der Testküvette, ist eine exakte Aktivitätsbestimmung unter diesen Bedingungen nicht möglich. Die die Fru 1-P-Kinase enthaltenden Fraktionen

sind nach der Chromatographie an Sephadex G-100 weitgehend frei von NADH-Oxidaseaktivität. Nach der ersten Chromatographie an Sephadex G-200 fand sich nahezu die gesamte NADH-Oxidaseaktivität in den dem 1. großen Peak entsprechenden Fraktionen des Eluates (Abb. 16).

3.4.3. Molekulargewicht

Eine Abschätzung des Molekulargewichts über Chromatographie an Sephadex G-100 (27) ergab für Fru 1-P-Kinase ein MG von etwa 80 000. Dieser Wert stimmte mit dem Wert für die Fru 1-P-Kinase von *A. aerogenes* (75 000) recht gut überein.

3.4.4. Charakterisierung der Fru 1-P-Kinase

Die Charakterisierung sollte zeigen, ob und gegebenenfalls wie sich das Enzym aus *K. citrophila* in seinen Eigenschaften von der aus *Aerobacter aerogenes* isolierten Fru 1-P-Kinase (17, 49, 50) unterscheidet.

3.4.4.1. steady state Kinetik

Für den Ablauf der Reaktion werden nur die Substrate Fru 1-P und MgATP^{2-} benötigt, wobei für eine optimale Geschwindigkeit (siehe aber auch: Einfluß von K^+) das Verhältnis von $\text{Mg} : \text{ATP} > 2:1$ sein muß. Ab einer ATP-Konzentration von 6,5 mM wirkt ATP bei konstantem Mg^{2+} (4,64 mM) hemmend. Die K_m für ATP beträgt 0,2 mM. Abb. 18 gibt die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der ATP-Konzentration in der Lineweaver Burk Auftragung wieder (zum Vergleich: $K_{m\text{ATP}} = 0,7 \text{ mM}$ bei Sapico und Anderson (48)).

Die aus Abb. 19 ermittelte K_m für Fru 1-P von 0,25 mM stimmt mit dem von Sapico und Anderson gefundenen Wert (17) von 0,75 mM recht gut überein. Gegenüber dem Substrat Fru 1-P zeigt die Fru 1-P-Kinase im Gegensatz zur Fru 6-P-Kinase normale hyperbolische Abhängigkeit in der Michaelis-Menten-Auftragung. Substrathemmung tritt nicht auf.

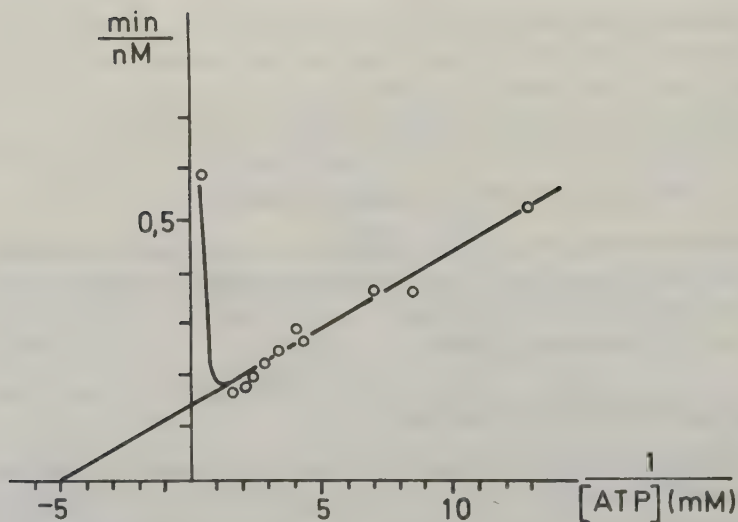


Abb. 18: Geschwindigkeit der Fru 1-P-Kinase in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration (nach Lineweaver und Burk). (Fru 1-P) lag sättigend vor; $(\text{Mg})^{2+} = 4,64 \text{ mM}$ $K_m(\text{ATP}) = 0,2 \text{ mM}$.
(Jeweils 0,06 U Enzym wurden eingesetzt)

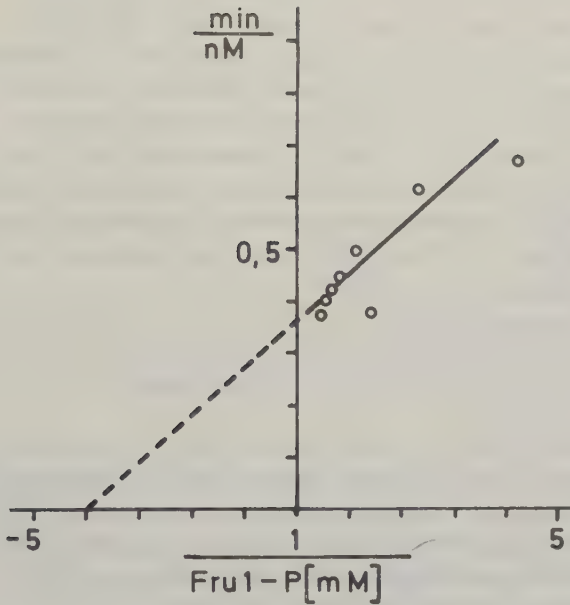


Abb. 19: Geschwindigkeit der Fru 1-P-Kinasereaktion in Abhängigkeit von der Fru 1-P-Konzentration (nach Lineweaver und Burk).
(Mg^{2+}) = 4,64 mM; (ATP) = 2,32 mM
 $K_m(\text{Fru 1-P}) = 0,25 \text{ mM}$.
(Jeweils 0,003 U Enzym wurden eingesetzt)

Der Einfluß von K^+

Die von Sapico bei Fru 1-P-Kinase aus *A. aerogenes* gefundene Aktivierbarkeit durch K^+ (50) trat auch bei Fru 1-P-Kinase aus *K. citrophila* auf (Abb. 20). Die ermittelte Kinetik des K^+ -Einfluß zeigt den Charakter einer "alles oder nichts-Reaktion". Wie Abb. 20 veranschaulicht, kann die Fru 1-P-Kinase auch ohne Vorhandensein von K^+ im Reaktionsansatz Substrat umsetzen. Die unter diesen Bedingungen gefundene Maximalgeschwindigkeit wurde bis zu einer Konzentration von 1 mM K^+ beibehalten. Ab 2 mM K^+ stieg die Maximalgeschwindigkeit sprunghaft um ca. 50 % an und blieb bis zu einer Konzentration von 9 mM K^+ konstant auf diesem Wert. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der K^+ -Konzentration wurde bei Substratsättigung ermittelt.

Der Einfluß von Mg^{2+}

Die Reaktionskinetik der Fru 1-P-Kinase zeigt bei Sapico und Anderson (17) in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration sigmoiden Verlauf in der Michaelis-Menten-Auftragung. Dabei kann eine Erhöhung der Konzentration des Zuckermorphosphats, im Gegensatz zur Phosphofructokinase, keine Verschiebung zu einem hyperbolischen Kurvenverlauf bewirken.

Hält man die Konzentration an Fru 1-P und ATP konstant enzymsättigend, so zeigt die Reaktionsgeschwindigkeit der Fru 1-P-Kinase aus *K. citrophila* bei Zugabe steigender Mengen Mg^{2+} in Abhängigkeit von diesem zweiwertigen Ion sigmoiden Kurvenverlauf in der Michaelis-Menten-Auftragung (Abb. 21). Die dabei auftretenden drei Plateaus deuten auf einen komplexen Reaktionsmechanismus bei der Fru 1-P-Kinase-Reaktion hin.

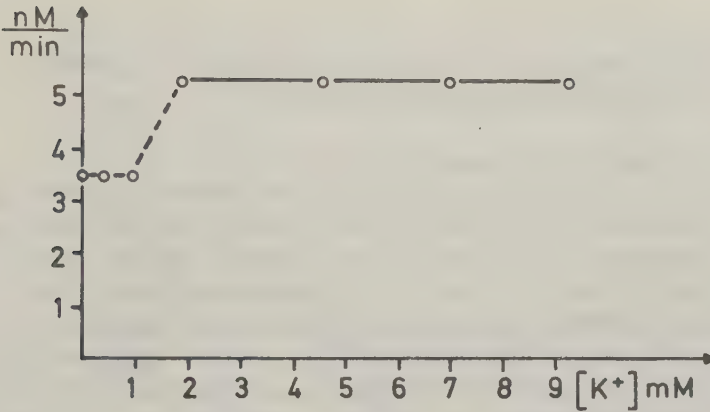


Abb. 20: Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Fru 1-P-Kinasereaktion von der K^+ -Konzentration.

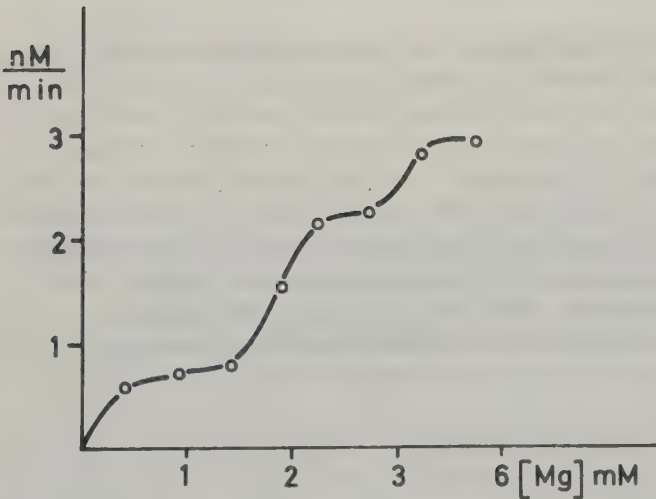


Abb. 21: Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Fru 1-P-Kinasereaktion von der Mg^{2+} -Konzentration.
(ATP) = 2,32 mM; (Fru 1-P) = 4,64 mM.

3.4.4.2. Das pre steady state Verhalten der gereinigten
Fru 1-P-Kinase von K. citrophila

Wenn die Phosphorylierungsreaktion mit Fru 1-P-Kinase gestartet wurde, so konnte erst nach einer gewissen Anlaufzeit, die, in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge bis zu 10 min andauerte, eine lineare Rate gemessen werden. Abb. 22 Kurve 2 zeigt das Bild, das bei der kontinuierlichen Registrierung des NADH-Verbrauchs bei 334 nm erhalten wird. Ist das zugegebene NADH verbraucht, so bewirkt eine erneute Zugabe von NADH eine Wiederholung dieses Effektes. Wird dagegen der Reaktionsansatz mit Fru 1-P-Kinase nach 10-minütigem Stehen mit NADH gestartet, so resultiert von Anfang an eine lineare Rate, die außerdem noch größer ist als die vorher erreichte (Abb. 22, Kurve 3). Die Reaktionsbedingungen waren dabei die gleichen wie bei Kurve 2.

In noch stärkerem Ausmaß wie durch Vorinkubation mit dem Substrat Fru 1-P ist die Fru 1-P-Kinase durch Ham 2^1 -P zu beeinflussen. Gibt man zum Reaktionsansatz zusätzlich Ham 2^1 -P, so zeigt sich eine Verschiebung der Anfangsrate, wie sie Abb. 23 wiedergibt. Die zweiphasige Kurve (Nr. 2) wird zu einer linearen (Nr. 3). Bei größeren Konzentrationen von Ham 2^1 -P geht der Effekt sogar soweit, daß die Anfangsrate zunächst sehr groß ist, und dann nach einiger Zeit (1-2 min) geringer wird (Nr. 4). Die linearen Raten sind in allen Fällen unterschiedlich. Freie Hamamelose im Reaktionsansatz zeigt keine Wirkung dieser Art.

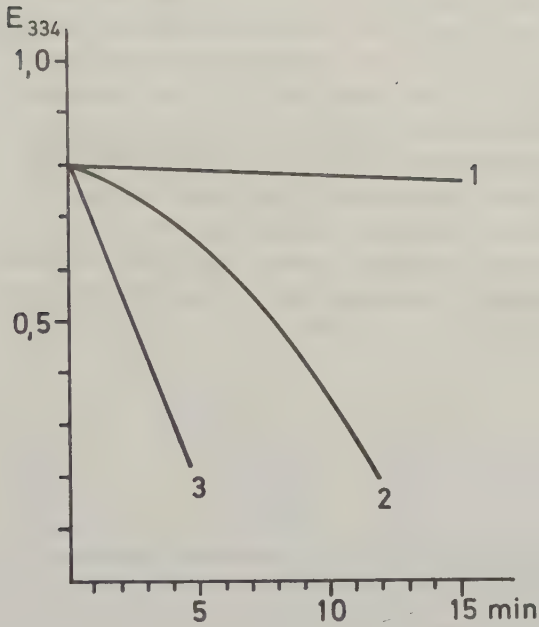


Abb. 22: Das pre steady state-Verhalten der Fru 1-P-Kinase:
Verlauf der Phosphorylierungsreaktion in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen.
1) Referenzwert (NADH-Oxidase)
2) Start mit Fru 1-P
3) Start mit NADH nach 10 min Vorinkubation

Dieser Effekt führt zu Schwierigkeiten, die bei der quantitativen Bestimmung der Enzymaktivität der Fru 1-P-Synthase mit Hilfe der Fru 1-P-Bestimmung auftreten (3.2.1.3.): Denn der Überstand des Fru 1-P-Synthase-Reaktionsansatzes enthält neben dem gebildeten Fru 1-P nicht ungesetztes Ham 2^1 -P, das den Test in der oben beschriebenen Weise beeinflusst. Ein qualitativer, schneller Nachweis der Fru 1-P-Synthase während der Anreicherung ist mit dieser Methode möglich, wie durch Parallelansätze mit radioaktiv markiertem Ham 2^1 -P gezeigt werden konnte.

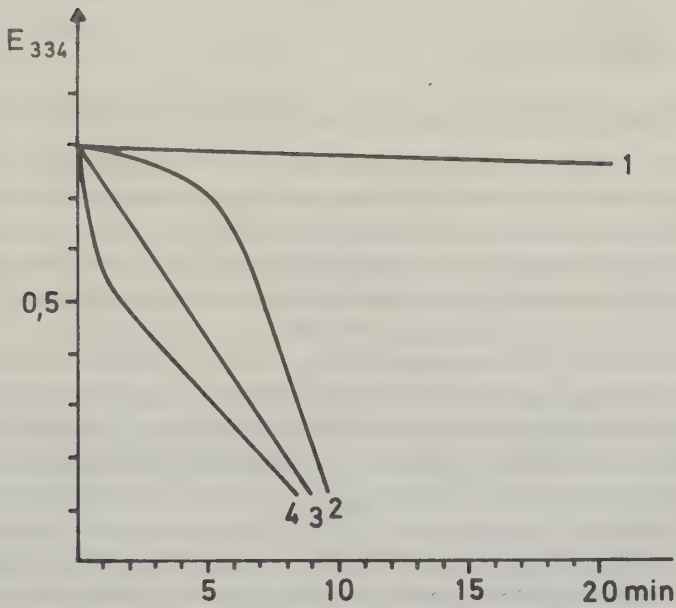


Abb. 23: Beeinflussung der Rate der Fru 1-P-Kinasereaktion durch Ham 2¹-P.
1) Referenzwert (NADH-Oxidase)
2) Fru 1-P-Kinase-Rate ohne Ham 2¹-P
3) + 0,25 μ M Ham 2¹-P
4) + 0,50 μ M Ham 2¹-P

4. Diskussion

4.1. Hamamelosekinase

Hamamelosekinase ist ein bisher noch nicht beschriebenes Enzym:

Wie Abb. 3 zeigt, kann *K. citrophila* 627 sowohl auf Glc wie auch auf Ham als einziger Kohlenstoffquelle wachsen. Es stellt sich nun die Frage, ob die Fähigkeit Hamamelose zu metabolisieren eine spezifische Hamamelosekinase erfordert, oder ob die Ham-Kinaseaktivität integraler Bestandteil von Hexokinase (E.C.2.7.1.1.) oder Glucokinase (E.C.2.7.1.2.) ist.

Wurde der Rohextrakt oder eine nicht hoch angereicherte Fraktion auf Substratspezifität hin untersucht, so zeigte sich erwartungsgemäß, daß neben Hamamelose auch Glucose phosphoryliert werden kann ($K_{mGlc} = 1,6 \text{ mM}$). Im Rohextrakt kann aber das Verhältnis der spezifischen Kinaseaktivitäten für Hamamelose und Glucose von Ham : Glc = 2 : 1 nach Ham : Glc = 1 : 12 verschoben werden, wenn man den Bakterien statt Hamamelose Glucose als Kohlenstoffquelle anbietet (26). Dieser Befund weist darauf hin, daß in *K. citrophila* nicht ein Enzym vorliegt, das beide Substrate verwerten kann, sondern daß verschiedene, substratinduzierbare Hexokinaseaktivitäten vorliegen.

Eine Identität der angereicherten Ham-Kinase mit Glucokinase (E.C.2.7.1.2.) ist auszuschließen, da das gereinigte aktive Enzym Glucose nicht mehr phosphorylieren kann. Das Vorliegen zweier Hexokinasen wird auch dadurch unterstrichen, daß der aus *K. citrophila* gewonnene Rohextrakt nach fünftägigem Stehen bei 4°C keinerlei Hamamelosekinaseaktivität mehr aufweist, während die Glucokinase unter diesen Bedingungen über Monate hinweg ohne nennenswerten Aktivitätsverlust stabil bleibt.

Von Hefehexokinasen (E.C.2.7.1.1.) ist bekannt, daß sie in verschiedenen isozymen Formen auftreten, die mit A, B und C bezeichnet werden (28). Die Formen A und B sind identisch mit den von Womack et al. isolierten Isozymen P I (= A) und P II (= B) (35, 40) und stellen native Isozyme dar. B und C, die aus β -Untereinheiten bestehen (41), sind vermutlich nur Konformationsisomere, die, abhängig von verschiedenen Parametern, wie z.B. Art der Isolierung und Ionenstärke des Puffers (42) entstehen und ineinander übergeführt werden können. Isozym A weist gegenüber B (und C) unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung auf (35).

Vorversuche hatten ergeben, daß Hamamelose mit käuflicher Hexokinase (Hersteller: Boehringer, Mannheim) nicht phosphorylierbar ist (55). Womack et al. (35) zeigten, daß diese (käufliche) Hexokinase mit dem Isozym P I (= A) identisch ist.

Die Möglichkeit, daß P I (= A) mit Hamamelosekinase identisch ist, scheidet wegen des Unvermögens dieses Enzyms aus, mit Hamamelose zu reagieren. Andererseits kann aber die Ham-Kinase auch nicht mit Form B (und C) identisch sein, da sie Glucose nicht phosphorylieren kann, während die hochgereinigten Isozyme A, B und C gegenüber Glucose als Substrat spezifisch Aktivitäten von 275 (A), 900 (B) und 750 (C) Einheiten pro mg Protein aufweisen (33).

Kinetische Daten

Verglichen mit den K_m -Werten anderer Phosphotransferasen (Tab. 11) zeigt die K_m von Hamamelosekinase (3 mM) eine physiologischen Vorstellungen durchaus entsprechende Substrataffinität. Die K_m -Werte für die beiden Substrate Ham und ATP stimmen mit 3 mM und 2,5 mM gut überein, wobei die geringe Differenz wohl eher auf die ATPase-Aktivität des

Enzyms als auf regulatorische Effekte des ATP zurückzuführen sein dürfte. Die K_m Glc für Glucokinase liegt in der gleichen Größenordnung.

Tab. 11:

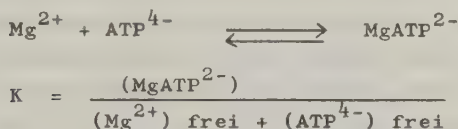
Vergleich der K_m -Werte verschiedener Phosphotransferasen (48) mit denen von Hamamelosekinase.

Enzym	Herkunft	Substrat		K_m (mM)	
Hamamelose-kinase	K.citrophila	Ham	ATP	3	2,5
Hexokinase E.C.2.7.1.1.	Hefe	Glc	ATP	0,1	0,2
Glucokinase E.C.2.7.1.2.	Säuger K.citrophila	Glc Glc	ATP -	20 1,6	0,49 -
Fructokinase E.C.2.7.1.4.	Erbse	Fru	-	<1	-
Ribokinase E.C.2.7.1.15.	Hefe	Ribose	-	1,2	-
Xylulokinase E.C.2.7.1.17.	A.aerogenes	Xylulose	ATP	1,6	4,6

Effektorwirkung des Mg^{2+}

Eindeutige Aussagen über eine Effektorwirkung des Mg^{2+} auf die Hamamelosekinase, welcher neben der Substrathemmung sowohl durch ATP wie auch durch Hamamelose regulatorische Bedeutung zukommen könnte, sind problematisch. Die von Bachelard (43) gefundene sigmoide Substratsättigungskurve von $MgATP^{2-}$ bei

Säugerhexokinase (Gehirn), die auf mögliche Kooperativität hinweist, wird von Fromm (51) aber als Verschiebung der Stabilitätskonstanten K des MgATP^{2-} -Komplexes gedeutet, die von der Art des Puffers (45), dem pH-Wert (46) und der Ionenstärke (47) abhängig ist:



Das würde bedeuten, daß bei sehr kleinen Werten von K bei einem stöchiometrischen Verhältnis von $\text{ATP} : \text{Mg} = 1 : 1$ das Gleichgewicht der genannten Reaktion überwiegend auf der Seite der freien Ionen und nicht auf der Seite des Komplexes MgATP^{2-} liegt. Da freies ATP^{4-} üblicherweise ein Inhibitor von Phosphotransferasereaktionen ist, wäre in diesem Falle also die Kinasereaktion durch das überschüssige ATP^{4-} stark gehemmt. Zusatz von Mg^{2+} über das stöchiometrische Verhältnis $\text{Mg} : \text{ATP} = 1 : 1$ hinaus, bewirkt eine Verschiebung des Gleichgewichts zum MgATP^{2-} -Komplex hin, wodurch die Hemmung der Kinasereaktion durch die Komplexbildung des freien ATP^{4-} zum Teil aufgehoben würde. Die Existenz einer sigmoiden Substratsättigungskurve aufgrund dieser Gleichgewichtsverschiebung ist theoretisch ableitbar.

Die für Hamamelosekinase erhaltenen Ergebnisse der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von Mg^{2+} sind aber mit einer Gleichgewichtsverschiebung allein nicht zu erklären: Im verwendeten TAA-Puffer ist der K-Wert für MgATP^{2-} mit $7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (51) hoch, so daß bei einem stöchiometrischen Verhältnis $\text{Mg} : \text{ATP} = 1 : 1$ überwiegend das komplexierte Nucleotid im Reaktionsansatz vorliegt.

Das Ergebnis von Abb. 10, wo sich eine sigmoide Substratsättigungskurve bei einer Steigerung von Mg^{2+} allein ergibt (Ham (4,24 mM) und ATP (5,31 mM) liegen in optimaler Konzentration vor), könnte für sich betrachtet als Hemmung der Reaktion durch freies ATP^{4-} gedeutet werden. Wird nun aber bei optimaler Hamamelosekonzentration (4,24 mM) die Konzentration von $MgATP^{2-}$ gesteigert (Abb. 11) so kann der sigmoide Kurvenverlauf nicht mehr mit einer anfänglichen Hemmung der Ham-Kinase durch freies ATP^{4-} erklärt werden.

Auf eine regulatorische Funktion des Mg^{2+} die über den rein kinetischen Effekt der Gleichgewichtsverschiebung der Dissoziations-Assoziationsreaktion des $MgATP^{2-}$ -Komplexes hinausgeht, weisen auch die folgenden Befunde hin:

- 1) Im suboptimalen Substratbereich (Hamamelose) wirkt freies Mg^{2+} im Reaktionsansatz (ATP : Mg = 5 : 6) stimulierend auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Kinasereaktion (Abb. 9), während in dem relativ schmalen Optimumsbereich des Enzyms für Hamamelose freies Mg^{2+} in überoptimaler Konzentration (5,31 mM) keine signifikante Effektorwirkung auf die Kinasereaktion zeigt (Abb.12).
- 2) Es hat sich gezeigt, daß freies Mg^{2+} im Reaktionsansatz bis zu einem gewissen Grad die Substrathemmung der Ham-Kinase durch Ham aufzuheben vermag.

Shill und Neet haben bei Hefehexokinase das Vorhandensein eines slow transition Prozesses aufgezeigt (53), der auf Kooperativität hinweist. Die Entscheidung, ob Hamamelosekinase einer ähnlichen Regulation mit Mg^{2+} als "Modifier" (siehe Diskussion: pre steady state Verhalten von Fru 1-P-Kinase) unterliegt, kann erst nach weitergehenden Untersuchungen gefällt werden.

Stabilität der Hamamelosekinase

Gegenüber der Glucokinase aus *K. citrophila*, die die für Hexokinasen übliche Stabilität aufweist, ist Hamamelosekinase äußerst instabil und bedarf der Stabilisierung durch das Substrat Hamamelose. Diese Substratstabilisierung ist aber nur bei einer hohen Enzymkonzentration der gereinigten Proteinfraction wirksam; letztere allein reicht aber nicht zur vollständigen Stabilisierung aus. Zusatz von Fremdprotein in Form von Serumalbumin zum gereinigten Enzym blieb ohne stabilisierenden Einfluß. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß bei einer sehr großen Enzymkonzentration Hamamelosekinase aufgrund spezifischer Protein-Protein-Wechselwirkung stabil sein könnte.^{*)}

Nach Kosow und Rose (38) scheint Isozym P II der Hefehexokinase in zwei pH-abhängigen Konformationsisomeren vorzuliegen: im sauren pH-Bereich vorwiegend in einer inaktiven und im leicht alkalischen in einer aktiven Form. Es wäre deshalb auch denkbar, daß die relative Stabilität der Hamamelosekinase im Rohextrakt (im Gegensatz zur Instabilität des gereinigten Enzyms) auf dem relativ sauren pH-Wert von 6,4 dieses Extrakts beruht. Bei diesem Wert zeigt sich jedoch keine Aktivität mehr. Man könnte also folgern, daß Hamamelosekinase wie Isozym P II in zwei pH-abhängigen Konformationen vorliegt. Die beim pH-Wert von 6,4 vorliegende Form sollte aufgrund ihrer anderen Konformation etwas stabiler sein, als die beim pH von 7,5 vorliegende aktive Form.

^{*)} Im vorliegenden Fall spielte der Umstand, daß das Substrat für die Bakterienanzucht erst aus Hamamelisrinde isoliert werden mußte, eine begrenzende Rolle für die Gewinnung von größeren Mengen an Proteinextrakten.

4.2. Fru 1-P-Synthase

Die Isolierung einer Fru 1-P-Synthase aus *K. citrophila*, die ohne Zwischenprodukte Ham 2^1 -P zu Fru 1-P umwandelt, unterstützt den Vorschlag von Thanbichler und Beck (10), die für diesen Reaktionsschritt eine intramolekulare Umlagerung annahmen. Für eine totale Metabolisierung von Ham 2^1 -P wären allerdings noch zwei weitere Möglichkeiten denkbar gewesen: Zunächst könnte Ham 2^1 -P durch eine Kinase zu Ham 2^{15} -bis-P phosphoryliert werden, das dann wie bei der Biosynthese über einen Aldolasemechanismus umlagert wird, oder Aldolase selbst vermag Ham 2^1 -P direkt in Triose und Triosephosphat zu spalten, die dann weiter abgebaut werden. Beide Möglichkeiten konnten jedoch ausgeschlossen werden:

- a) Bei der Fru 1-P-Synthasereaktion war kein ATP zugegen, sondern nur Ham 2^1 -P, Ham und angereichertes Enzym, so daß eine Phosphorylierung zu HDP nicht möglich war.
- b) Wie ein Versuch zeigte, kann Ham 2^1 -P in vitro nicht durch Aldolase (E.C.4.1.2.13., Boehringer, Mannheim) gespalten werden.

Die Fru 1-P-Synthase ist als Katalysator der Schlüsselreaktion der Sequenz $\text{Ham} \rightarrow \text{Ham } 2^1\text{-P} \rightarrow \text{Fru 1-P} \rightarrow \text{FDP}$ offensichtlich von den Metaboliten dieser Reaktionsfolge reguliert: Ohne die Anwesenheit von freier Hamamelose findet überhaupt keine Umlagerung statt. Antagonistisch zu der aktivierenden Wirkung der Hamamelose tritt in vitro im Rohextrakt von Bakterien die in der log-Phase aufgeschlossen wurden, offensichtlich ein Inhibitor der Synthase-reaktion auf, der mit zunehmendem Alter der Bakterienkultur im Rohextrakt verschwindet. Zusätzlich könnte eine Endprodukthemmung nach Art eines feedback-Mechanismus vorliegen: Bei dem Versuch, durch Zugabe von RE 12 zu RE 24,

einen in vitro auftretenden Inhibitor während der log-Phase nachzuweisen, zeigte sich, daß der Fru 1-P-Pool wesentlich stärker anwuchs als wenn kein Inhibitor in Form von RE 12 zugegeben wurde. Diese verhältnismäßig hohe Konzentration an Fru 1-P könnte die geringere Umsatzrate von Ham 2¹-P (57 % gegenüber 82 % : Tab.5) bewirken.

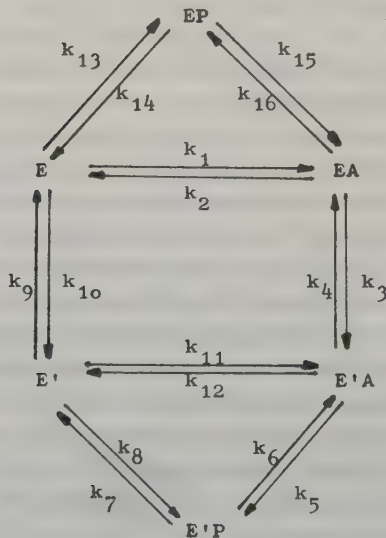
Hinsichtlich des Umlagerungsmechanismus läßt sich aus den vorliegenden enzymatischen Studien nur schließen, daß ein Abdissoziieren von Hexose P-Spalthälften mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Sie müßten, da sie ¹⁴C-markiert waren, auf alle Fälle bei den angewendeten in vitro-Bedingungen auf den Chromatogrammen nachweisbar sein.

4.3. Fru 1-P-Kinase

Die Ergebnisse der steady state Kinetik weisen die Fru 1-P-Kinase als ein Enzym aus, das mit beiden Substraten der Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Ergebnisse jüngeren Datums (Übersicht: Fromm (51)) haben jedoch gezeigt, daß auch solche Enzyme kooperatives Verhalten zeigen können, ohne daß Allosterie vorliegen muß. Das pre steady state Verhalten der Fru 1-P-Kinase legt den Verdacht nahe, daß es sich um ein solches Enzym handeln könnte. Ein Modell, mit dem die pre steady state Kinetik der Fru 1-P-Kinase gedeutet werden könnte, ist das slow transition Modell von Ainsli et al. (52). Dieses beinhaltet sog. "burst" und "lag"-Phasen im zeitlichen Verlauf der Reaktion; als solche können auch die unterschiedlichen Raten bei der Fru 1-P-Kinasereaktion gedeutet werden (Abb.22, Kurve 2 und Abb. 23, Kurve 2, zeigen eine solche "burst"-Phase; Abb. 23, Kurve 4, zeigt eine "lag"-Phase). Shill (53)

fand bei Hefehexokinase B das gleiche Phänomen. Auch bei anderen Enzymen (52, 54) wurden ähnliche Reaktionskinetiken gefunden.

Das slow transition Modell erklärt Abweichungen von der Michaelis-Menten-Kinetik durch das Auftreten eines zusätzlichen Reaktionsschrittes des Enzyms. Dieser Schritt ist im Vergleich zu den anderen katalytischen Schritten langsam und wird durch Substrat beeinflusst. Dabei kann es sich um die Isomerisierung zweier Konformationszustände des Enzyms, um einen Dissoziations- und Assoziationsprozess von Untereinheiten oder um die Bindung eines weiteren Liganden handeln. Das folgende Schema (52) zeigt den einfachsten Mechanismus dieses Modells: die Enzymisomerisierung.



E und E' sind dabei die verschiedenen Enzymisomere, EP und E'P bezeichnen die Enzymproduktkomplexe am Ende der Reaktion und EA und E'A entsprechend die Enzymsubstratkomplexe. Je nach Größe der Reaktionskonstanten zeigt die Gesamtkinetik der Reaktion hyperbolische oder sigmoide Substratsättigungskurven oder slow transients mit burst- und lag-Phasen.

Die Aufhebung der burst-Phase der Fru 1-P-Kinasereaktion durch Vorinkubation mit dem Substrat Fru 1-P läßt sich zwanglos mit diesem Modell erklären: Wie Hexokinase, die abhängig vom pH-Wert in zwei Konformationsisomeren vorliegen kann, von denen nur eines katalytisch aktiv ist (38), könnte auch Fru 1-P-Kinase zwei unterschiedlich aktive, isomere Zustände vorweisen, wobei Inkubation des Enzyms mit Substrat eine Gleichgewichtsverschiebung zur aktiven Enzymform bewirken sollte. Wird die Reaktion mit Fru 1-P-Kinase gestartet, so benötigt der Isomerisierungsvorgang eine gewisse Zeitspanne, so daß eine lineare Rate erst nach einigen Minuten erreicht wird. Beim Start der Reaktion mit NADH nach 10-minütiger Inkubation des Enzyms mit Fru 1-P ist die Isomerisierung bereits erfolgt und es ergibt sich von Anfang an eine lineare Rate (Abb.22).

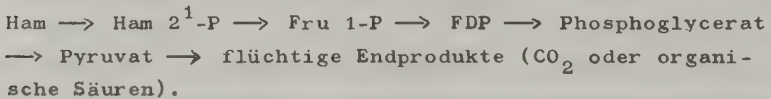
Die Vermutung, daß die Steigerung der Maximalgeschwindigkeit durch K^+ durch die Modifizierung dieses Ions - K^+ würde dann die Rolle eines weiteren Liganden spielen - bleibt Hypothese, da eine quantitative Auswertung der vielen Reaktionsgleichgewichte nur mit Computer möglich ist. Zu den 16 Gleichgewichtskonstanten des oben abgebildeten Schema kämen noch einmal 28 hinzu, da K^+ mit jedem Zwischen- oder Endprodukt im Gleichgewicht steht. Die Ermittlung des geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschrittes ist dadurch extrem schwierig.

Das slow transition Modell erklärt aufgrund der vielen Gleichgewichtskonstanten auch bizarre Kinetiken. Bei dem Kurvenverlauf der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Fru 1-P-Kinase von der Mg^{2+} -Konzentration scheint ein solcher Fall mit mehreren Übergangszuständen vorzuliegen (Abb. 21).

Vergleiche der Ergebnisse von Fru 1-P-Kinase aus *Aerobacter aerogenes* (16/17) und *K. citrophila* zeigten, daß - vielleicht mit Ausnahme des geschilderten pre steady state Verhaltens der Fru 1-P-Kinase aus *K. citrophila* - eine weitgehende Identität beider Enzyme gegeben sein dürfte.

4.4. Regulation des Abbaus

Der Abbau von Hamamelose durch *K. citrophila* verläuft nach Thanbichler und Beck über folgende Reaktionssequenz (10):



Die ersten drei Reaktionsschritte sind in diesem Fall von besonderem Interesse, weil mit Hilfe der dabei benötigten Enzyme der verzweigt-kettige Zucker zum unverzweigt-kettigen wird, der in die Reaktionsfolge der Glycolyse eingeschleust werden kann. Die dafür notwendigen Enzyme Hamamelosekinase, Fru 1-P-Synthase und Fru 1-P-Kinase wurden in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen und charakterisiert. Damit kann die Synthese von FDP aus Ham und ATP in vitro vollzogen werden, und der Vorschlag von Thanbichler und Beck (10) wird von der enzymatischen Seite her gestützt.

Das in Abb. 24 wiedergegebene Schema faßt die aus den enzymatischen Untersuchungen hervorgegangenen Beobachtungen im Hin-

blick auf die Regulation des Hamameloseabbaus zusammen: Der erste Schritt in der Reaktionsfolge wird durch eine spezifische Hamamelosekinase katalysiert. Neben dem pH-Wert und den Konzentrationsverhältnissen von Mg^{2+} , ATP^{4-} und $MgATP^{2-}$ wirkt auch das Substrat Hamamelose auf die Ham-Kinase, da es, ebenso wie $MgATP^{2-}$ im Überschuß die Reaktion hemmt. Die Hemmung der Ham-Kinase durch $MgATP^{2-}$ (Konz. > 6 mM) ist ein erwartetes Phänomen. Überraschend dagegen ist die auftretende Substrathemmung durch Ham ab ~ 5 mM Ham im Reaktionsansatz, die sonst bei Hexokinasen nicht zu beobachten ist. Eine Niveauregelung des schmalen optimalen Konzentrationsbereiches in der Zelle müßte über ein durch Ham reguliertes Transportsystem erfolgen. Einen Hinweis für eine solche Regulation durch Ham gibt auch der Befund, daß zumindest in vitro die Fru 1-P-Synthase-reaktion ohne Ham nicht ablaufen kann.

Die Fru 1-P-Synthase lagert in einem Reaktionsschritt Ham $2^{1-}P$ zu Fru 1-P um. Sie benötigt wie schon erwähnt in vitro außer dem Substrat Ham $2^{1-}P$ nur Hamamelose als Effektor. Im Rohextrakt, der aus 12 h alten Kulturen gewonnen wurde, ist keine Fru 1-P-Synthaseaktivität nachweisbar, obwohl sie in vivo vorhanden sein muß, da *K. citrophila* auf Ham als einziger Kohlenstoffquelle gut wachsen kann. Vielleicht ist beim Homogenisieren der Zellen durch Aufhebung der Kompartimentierung ein Inhibitor der Synthase-reaktion freigesetzt worden. Hinweise dafür gibt die Inhibierung der Synthasereaktion im RE 24 nach Zugabe von RE 12. Ungeklärt bleibt aber, warum RE 24 keinen Inhibitor mehr enthält.

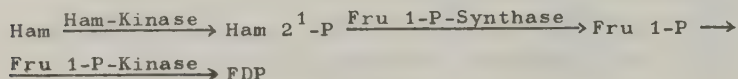
Eine Endprodukthemmung nach einem feedback Mechanismus könnte eine weitere mögliche Regulationsform sein, wie das Anwachsen des Fru 1-P-Pools bei Zugabe von RE 12 zu RE 24 andeutet.

Die Fru 1-P-Kinase, die die letzte Reaktion dieser Sequenz katalysiert, wird außer von ATP und Mg, bzw. dem Molverhältnis der beiden, von K^+ , vom Substrat Fru 1-P und von Ham 2¹-P beeinflusst. Die Effektorwirkung des letzteren könnte aufgrund der Identität des C₃C₄C₅ Endes des Ham 2¹-P mit dem C₄C₅C₆ Ende des Fru 1-P als Konkurrenz gedeutet werden; sicher spielt hierbei auch die Phosphatgruppe eine Rolle, da freie Hamamelose die Fru 1-P-Kinase nicht beeinflusst. Ham 2¹-P könnte eine schnelle Isomerisierung des Enzyms in die aktive Konformation (nach dem slow transition Modell) bewirken, ähnlich wie es das Substrat Fru 1-P mit langsamer Geschwindigkeit vermag.

Zum Schluß sei nochmals betont, daß die diskutierten Befunde nur den aktuellen Stand der Kenntnisse wiedergeben. Selbstverständlich bedarf das Verständnis der Regulation des Hamamelosekatabolismus noch weiterer klärender Untersuchungen.

5. Zusammenfassung

Nach Thanbichler (9) können die die verzweigtkettige Hexose Hamamelose (2-C-(hydroxymethyl)-D-Ribose) synthetisierenden Pflanzen das Kohlenstoffgerüst dieses Zuckers nicht mehr metabolisieren. Bakterien der Art *Kluyvera citrophila* 627 katabolisieren Hamamelose nach folgender Sequenz (10):



Das entstehende FDP wird in die Glycolyse eingeschleust.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die drei Enzyme nachzuweisen und soweit als möglich zu charakterisieren.

Die drei für diese Reaktionsfolge speziell erforderlichen Enzyme Hamamelosekinase (ATP: Hamamelose 2^1 -Phosphotransferase), Fructose 1-phosphat Synthase (Hamamelose 2^1 -phosphat Aldehydlyase) und Fructose 1-phosphat Kinase (ATP: Fructose 1-phosphat 6 Phosphotransferase E.C.2.7.1.56) konnten in *Kluyvera citrophila* nachgewiesen, aus dem Rohextrakt angereichert und dann charakterisiert werden.

1. Hamamelosekinase

- a) Hamamelosekinase (750-fach angereichert) ist mit keiner bisher beschriebenen Hexokinase identisch und ist streng spezifisch für Hamamelose. Wie andere Kinasen weist sie ATPase-Aktivität auf ($K_m \text{ATP} = 2,5 \text{ mM}$). Überraschenderweise zeigt Hamamelosekinase aber neben einer erwarteten Hemmung durch MgATP^{2-} (ab einer Konzentration von $\sim 6 \text{ mM MgATP}^{2-}$)

eine für Hexokinasen unübliche Substrathemmung durch das Substrat Hamamelose (ab einer Konzentration von 5 mM Ham; $K_{m\text{Ham}} = 3 \text{ mM}$).

- b) Das Molekulargewicht wurde zu 50 000 abgeschätzt.
- c) Das pH-Optimum liegt sowohl für die Kinase- als auch für die ATPase-Reaktion bei pH 7,5.
- d) Die im Vergleich zu anderen Hexokinasen extreme Instabilität der Ham-Kinase kann durch Zugabe von Substrat zum Teil aufgehoben werden.
- e) Die Substratsättigungskurven mit Mg^{2+} und MgATP^{2-} zeigen in der Michaelis-Menten-Auftragung sigmoiden Verlauf und deuten damit auf einen regulatorischen Effekt des Mg^{2+} hin.

2. Fructose 1-phosphat-Synthase

- a) Fructose 1-phosphat-Synthase (10-fach angereichert) setzt Ham 2^{1-}P in einem Reaktionsschritt zu Fru 1-P um, wobei keine freie Triose oder Triose P nachweisbar ist.
- b) Für den Ablauf der Reaktion ist das Vorhandensein von freier Hamamelose neben dem Substrat Ham 2^{1-}P im Reaktionsansatz erforderlich.
- c) Das Enzym kann nur im Extrakt von Bakterien nachgewiesen werden, die aus der stationären Wachstumsphase geerntet wurden. Die Existenz eines Inhibitors der Fru 1-P-Synthase-Reaktion im Rohextrakt von Bakterien, die während der lag-Phase aufgeschlossen wurden, konnte wahrscheinlich gemacht werden.
- d) Das Gleichgewicht der Synthesereaktion liegt nicht deutlich auf einer Seite.
- e) Hinweise auf eine Endprodukthemmung über einen feedback-Mechanismus liegen vor.

3. Fructose 1-phosphat-Kinase

- a) Fructose 1-phosphat-Kinase (42-fach angereichert; Molekulargewicht 80 000) kann aufgrund einer hohen NADH-Oxidaseaktivität im Rohextrakt nicht eindeutig nachgewiesen werden. Erst in der angereicherten Proteinfraction konnte nach Abtrennung der NADH-Oxidase das Vorhandensein von Fru 1-P-Kinase in *K. citrophila* gezeigt werden.
- b) In ihrer Kinetik ist die Fru 1-P-Kinase durch zwei unterschiedliche Bereiche gekennzeichnet: Einem steady state Bereich, in dem sie hinsichtlich $MgATP^{2-}$ ($K_m = 0,2 \text{ mM}$) und Fru 1-P ($K_m = 0,25 \text{ mM}$) einer normalen Michaelis-Menten-Kinetik gehorcht, und einem pre steady state Bereich, wo die Abhängigkeit der Umsatzrate von der Zeit nicht linear ist.
- c) K^+ kann die Umsatzgeschwindigkeit steigern, ist aber für den Ablauf der Reaktion nicht unbedingt erforderlich.
- d) Die Substratsättigungskurve für Mg^{2+} ergibt in der Michaelis-Menten-Auftragung sigmoiden Kurvenverlauf mit drei Plateaus.
- e) Ham 2^1 -P ist ein Effektor der Fru 1-P-Kinase.
- f) Die Befunde wurden nach dem slow transition Modell von Ainsli et al. (52) gedeutet. Mit diesem Modell lassen sich die Kooperativität (Mg^{2+}) und die Geschwindigkeitsunterschiede zwanglos erklären.

4. Die von Thanbichler und Beck (10) vorgeschlagene Reaktionsfolge von Ham über Ham 2^1 -P und Fru 1-P zu FDP konnte mit den angereicherten Enzymen in vitro nachvollzogen werden, wodurch der mit Isotopenstudien ermittelte Reaktionsweg (10) von der enzymatischen Seite her unterstützt wurde.

5. Die aktuellen Vorstellungen über die Regulation der Sequenz $\text{Ham} \rightarrow \rightarrow \rightarrow \text{FDP}$ wurden in einem Schema (Abb. 22) zusammengefaßt.

6. Literaturverzeichnis

1. Hanessian S. und Haskell T.H.in: W.Pigman, D.Horton (eds):
The Carbohydrates Vol. II A 139-211. Academic Press 1970.
2. Grisebach H., und U.Döbereiner: Z.Naturforschg. 21b,
429 (1966).
3. Beck E., und O. Kandler: Z.Pflanzenphysiol. 55, 71
(1966).
4. Sandermann H. und H. Grisebach: Biochim. Biophys. Acta
208, 173 (1970).
5. Kindel P.K., D.L.Gustine und R.R.Watson: Plant Physiol.
46, 27 (1970).
6. Gilck H. und E.Beck: Z.Pflanzenphysiol. 72, 395-409
(1974).
- 6a. Gilck H.: Dissertation, München 1972.
7. Beck E. und J.Knaupp: Z.Pflanzenphysiol. 72, 141-157
(1974).
8. Beck E. und H.Gilck: Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chemie
354, 1194 (1973).
9. Thanbichler A.: Dissertation, München 1973.
10. Thanbichler, A. und E. Beck: Eur.J.Biochem. 50,
191-196 (1974).

11. Watson R.R. und N.S.Ohrenstein: Adv. Carbohydr. Chem. a. Biochem. Vol. 31, 135-184, Academic Press 1975.
12. Baron D., U.Streitberger und H.Grisebach: Biochim. Biophys.Acta 293, 525 (1973).
13. Hanna R., M.Dicken und J.Mendicino: Biochim.Biophys. Acta 315, 259 (1973).
14. Grisebach H. und R. Schmid: Angew.Chem. 84, 192-206 (1972).
15. Reeves R.E., L.G.Warren und D.S.Hsu: J.Biol.Chem. 241, 1257 (1966).
16. Hanson, R.E, und R.L.Anderson: J.Biol.Chem. 241, 1644 (1966).
17. Sapico V. und R.L.Anderson: J.Biol.Chem. 244, 6280 (1969).
18. Gilck, H., A.Thanbichler, J.Sellmair und E.Beck: Carbohydr.Res. 39, 160 (1975).
19. Thanbichler, A., H.Gilck, E.Beck: Z.Naturforsch. 26b, 912 (1971).
20. Beck, E.: Z.Pflanzenphysiol. 61, 360-366 (1969).
21. Scherpenberg, H.van, W.Gröbner und O.Kandler: Festschrift K.H.Mothes zum 65. Geburtstag. VEB Verlag G.Fischer, Jena 1965, S. 387.
22. Clotten R, und A.Clotten: Hochspannungselektrophorese. Thieme 1962.

23. Consden R., W.M.Stanier: Nature 169, 783 (1952).
24. Trevelyan W.D., D.D.Procter und J.S.Harrison:
Nature 166, 444 (1950).
25. Cifonelli J.A. und F.Smith: Analytic.Chem. 26,
1132 (1954).
26. Reinecke W.: Staatsexamensarbeit, München 1974.
27. Andrews P.: Biochem.J. 91, 222 (1964).
28. Purich, D.L., H.J. Fromm und F.B.Rudolph. Advances
Enzymology 39, 249, Wiley 1973.
29. Hammes G.G. und D.J.Kochavi: J.Amer.Chem.Soc. 84,
2069 (1962).
30. Zewe V., H.J. Fromm und R.Fabiano: J.Biol.Chem. 239,
1625 (1964).
31. Bergmeyer H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie 1970.
32. Trayser K.A. und S.P.Colowick: Arch.Biochem.Biophys.
94, 161 (1961).
33. Rustum, Y.M., A.H.Ramel und E.A.Barnard: Prep.Biochem.1,
309 (1971).
34. Lowry, O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr und R.L.Randall:
J.Biol.Chem. 193, 265 (1951).

35. Womack F.C., K.Welch, J.Nielsen und S.P.Colowick:
Arch.Biochem.Biophys. 158, 451 (1973).
36. Maurer, H.R.: Disc Elektrophorese. Berlin 1968.
37. Dela Fuente G., A.Sols: Biochem.J. 89, 36 P (1963).
38. Kosow, D.P., J.A. Rose: J.Biol.Chem. 246, 2618 (1971).
39. Asai T., H.Jisuka und K.Komagata: J.Gen.Appl.Microbiol.
8, 187 (1962).
40. Schulze J.T., S.P.Colowick: J.Biol.Chem. 244, 2306
(1969).
41. Rustum Y.M., E.J.Massaró, E.A.Barnard: Biochemistry 10,
3509 (1971).
42. Ramel A.H., Rustum Y.M., J.G.Jones und E.A.Barnard:
Biochemistry 10, 3499 (1971).
43. Bachelard H.S.: Biochem.J. 125, 249 (1971).
44. Purich D.L. und H.J. Fromm: Biochem.J. 130, 63 (1972).
45. Good N.E., G.D.Winget, W.Winter, T.N.Conolly, S.Izawa und
R.M.M.Sing: Biochemistry 5, 467 (1966).
46. Rudolph D.L., H.J.Fromm: J.Biol.Chem. 244, 3832 (1969).
47. Noat G., J.Ricard, M.Borel und C.Got: Eur.J.Biochem. 5,
55 (1968).

48. Barman T.: Enzyme Handbook Vol. I + II + Suppl.
Berlin 1969, 1974.
49. Anderson R.L., T.E.Hanson, V.L.Sapico: Meth.Enzymology
XLII C, 63, Academic Press 1975.
50. Sapico V. und R.L.Anderson: J.Biol.Chem. 245, 3252
(1970).
51. Fromm H.J.: Initial Rate Enzyme Kinetics.
Berlin 1975.
52. Ainsli G.R., J.P.Shill, K.E.Neet: J.Biol.Chem. 247,
7088 (1972).
53. Shill J.P. und K.E.Neet: Biochem.J. 123, 283 (1971).
54. Frieden C.: J.Biol.Chem. 245, 5788 (1970).
55. Beck, E.: persönliche Mitteilung.
56. Sellmair J. und O.Kandler: Z.Pflanzenphysiol. 63,
65 (1970).
57. Hirs, C.H., W.S.Moore und W.H.Stein: J.Biol.Chem. 195,
669 (1952).
58. Beck,E., J.Sellmair und O.Kandler: Z.Pflanzenphysiol.
58, 434 (1968).

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Erwin Beck am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Professor Beck danke ich sehr herzlich für die wertvollen Ratschläge und sein großes Interesse an meiner Arbeit.

Lebenslauf

Am 6. Februar 1948 wurde ich in München geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Unterhaching von 1954 - 1958 trat ich im Herbst 1958 an die Frühlingsoberrealschule (jetzt: Asamgymnasium) in München über, an der ich 1968 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1968/69 begann ich an der Universität München das Studium der Fächer Biologie und Chemie. Ich beendete das Studium Ende 1972 mit der wissenschaftlichen Prüfung für das Lehramt am Gymnasium in den Fächern Biologie und Chemie.

Mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation begann ich im Januar 1973 am Botanischen Institut der Universität München unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ervin Beck.

Am gleichen Institut war ich anfangs als wissenschaftliche Hilfskraft, danach als DFG - Stipendiat und ab Januar 1975 als VDWA tätig. Seit September 1975 bin ich als VDWA an der Universität Bayreuth angestellt.

Im März 1973 heiratete ich Fräulein Sylvia Groß.

Am 19. Januar 1975 wurde unser Sohn Tobias geboren.

